三重大学 Mie University Scholarly E-collections
学術機関リポジトリ 研究教育成果コレクション

Master's Thesis / 修士論文

フィブロネクチン濃度勾配を駆動力とするコラーゲンゲル内EMT細胞の3次元遊走

山口, 陽平

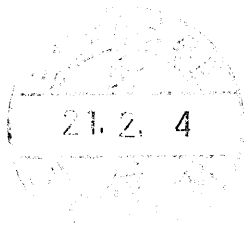
三重大学, 2008.
三重大学大学院工学研究科博士前期課程分子素材工学専攻

http://hdl.handle.net/10076/10886

複写可

平成20年度　修士論文

フィブロネクチン濃度勾配を駆動力とするコラーゲンゲル内EMT細胞の3次元遊走



三重大学大学院工学研究科　博士前期課程
分子素材工学専攻

山口　陽平

修士論文目次

1. 緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P. 1

1-1 腹膜透析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P. 1

1-1-1 腎不全・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P. 1
1-1-2 連続携行式腹膜透析治療(CAPD)・・・・・・・・・・・・・・・P. 2
1-1-3 腹膜・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P. 3
1-1-4 腹膜透析による合併症・・・・・・・・・・・・・・・・・・P. 3

1-2 EMT・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P. 5

1-2-1 EMT とは・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P. 5
1-2-2 EMT を誘導する因子・・・・・・・・・・・・・・・・・・P. 5

1-3 細胞の遊走・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P. 7

1-3-1. EMT における細胞遊走・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.7
1-3-2. 化学走化性因子・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.8

1-4. フィブロネクチン(FN)とα5β1-integrin・・・・・・・・・P. 10

1-4-1. FN の構造と機能・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.10
1-4-2. integrin と細胞外マトリクスの関係と役割・・・・・・・・・P.11
1-4-3. α5β1-integrin と細胞外マトリクスの関係と役割・・・・・・・P.12
1-4-4. Syndecan と FN の関係と役割・・・・・・・・・・・・・・・P.13

2.目的・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P. 14

3.方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P. 15

3-1 実験系の作成・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P. 15

3-1-1 ヒト大網由来中皮細胞(HPMC)の培養・・・・・・・・・・・・P. 15

・ 培地の調整
・ 初代培養の方法
・ 継代培養の方法
3-1-2 HPMC への TGF-β1 誘導・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P. 16
・ Growth-arrest
・ ＴＧＦ－β1 曝露
3-2 TGF-β 曝露による細胞の形態変化の動画（及び静止画）撮影・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P. 16
3-3 TGF-β 暴露による Snail と E-cadherin、α5-integrin、MMP-2 mRNA の経時変化の測定・・・・・・・・・・・・・・・・・P. 17
3-3-1 AGPC 法による mRNA の抽出と定量・・・・・・・・・・・・・・P. 17
3-3-2 mRNA の逆転写による cDNA の作成と PCR による Snail、E-cadherin、α 5-integrin 及び MMP-2 DNA の増幅・・・・・・・・・・・・・P. 17
3-3-3. 電気泳動とバンドの定量・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.18
3-4. 化学走化性因子を用いた EMT 細胞の三次元細胞遊走評価・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.19
評価モデルの作成
3-4-1. FN および BSA を用いた三次元遊走モデルの作成・・・・・・・P.19
3-4-2. RGDS 阻害剤による FN 存在下での三次元遊走モデルの作成・・P.20
3-4-3. 遊走細胞数の計測・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.20
3-4-4. 細胞増殖測定・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P. 20
3-5. TGF-β1 誘導時の FN 添加及び RGDS 阻害による α-SMA の経時測定・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.21
3-5-1. タンパク質の抽出と BCA 法による定量・・・・・・・・・・・・P.21
3-5-2. SDS-PAGE によるタンパク質の分離・・・・・・・・・・・・・・P.21
3-5-3. 膜への転写（ウェスタンブロッティング）・・・・・・・・・・・P.22

3-5-4. 抗体反応とバンドの定量・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.22

4.結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.23

4-1. TGF-β1 誘導による細胞の形態変化の観察・・・・・・・P.23

4-2. TGF-β1 誘導による細胞の遊走距離の測定・・・・・・・P.24

4-3. TGF-β1 誘導による Snail 及び E-cadherin、α5-integrin 、MMP-2 mRNA の経時的測定・・・・・・・・・・・・・・P.25

4-3-1. Snail mRNA・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.25
4-3-2. E-cadherin mRNA・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.26
4-3-3. α5-integrin mRNA・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.27
4-3-4. MMP-2 mRNA・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P28

4-4. 化学走化性因子を用いた EMT 細胞の三次元細胞遊走評価・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.29

4-4-1. FN を用いた遊走細胞数の計測・・・・・・・・・・・・・・・P.29
4-4-2. BSA を用いた遊走細胞数の計測・・・・・・・・・・・・・・P.29
4-4-3. FN を用い、RGDS により阻害した際の遊走細胞数の計測・・・P.30
4-4-4. 細胞増殖試験・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.31

4-5. TGF-β1 誘導時の FN 添加及び RGDS 阻害によるα-SMA の経時的測定・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.32

5.考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P. 33

5-1. 腹膜透析による TGF-β1 産生機序・・・・・・・・・・・P.33

5-2. TGF-β1によるSnail mRNA発現に伴うE-cadherin mRNAの減少メカニズムとその役割・・・・・・・・・・・・・・・・P.34

5-3. EMT誘導HPMCにおけるα5-integrin、MMP-2 mRNAおよびα-SMAの遊走における役割・・・・・・・・・・・・・P.36

5-4. FN阻害剤としてのRGDSの妥当性・・・・・・・・・・P.39

5-5. 総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.40

6.結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.41

7.今後の展望・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.43

8.参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P. 44

9.謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P. 49

10.ＡＰＰＥＮＤＩＸ・・・・・・・・・・・・・・・・・・P. 50

A-1. 細胞培養プロトコル・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.50
A-2. 細胞の2次元遊走距離の測定（Image Jの使い方）・・・・・・・・P.56
A-3. AGPC法プロトコル・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.60
A-4. RNA定量プロトコル・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.63
A-5. RT-PCRプロトコル・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.65

A-6. ウェスタンブロット法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.82
A-7. 三次元細胞遊走モデルの作製 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.96
A-8. 細胞増殖試験・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.102
B-1. 滅菌について ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.105
B-2. Primer List・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.107
B-3. RT/PCR program・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.108
B-4. 統計処理・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・P.110

1. 緒言

1-1. 腎不全と腹膜透析

1-1-1. 腎不全[1,2]

腎臓は尿管や血管、実質（皮質及び髄質）などから構成されている（Fig.1-1、1-2)。実質は主に糸球体とボウマン嚢で構成される腎小体とそれに続く尿細管で構成され、その構成単位はネフロンと呼ばれる（Fig.1-3、1-4)。このネフロンといわれる組織が、腎臓の機能である体内の不要な老廃物や水分の排除、電解質（ナトリウム、マグネシウム、リンなど）やpHの調節などを行っている。また尿の排泄によって、タンパク質代謝産物（尿素、クレアチニンなど)の除去や血液の浸透圧･pH調整、細胞外液量の調節が行われる。しかし免疫系の異常や薬に対するアレルギー、高血圧、糖尿病などが原因で腎臓が十分に機能しなくなる。このような状態になることを腎不全といい、週単位で急激に起こる可逆性の急性腎不全と、年単位で進行する不可逆性の慢性腎不全に大別される。また腎不全は腎臓の機能が50%を下回ることをいい、10%をきると末期腎不全とよび、何らかの対処療法を受けなければ死に至る。

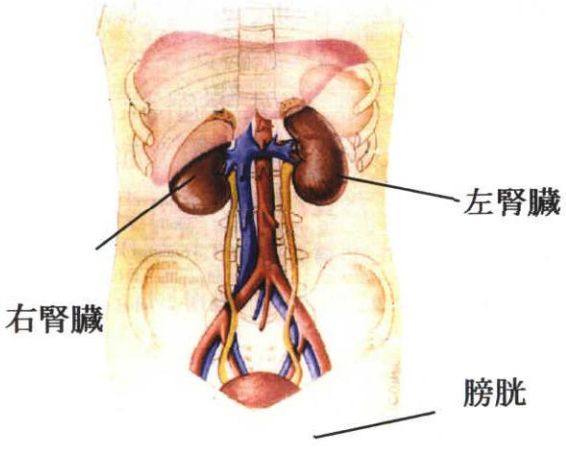


Fig.1-1 泌尿器系器官の位置

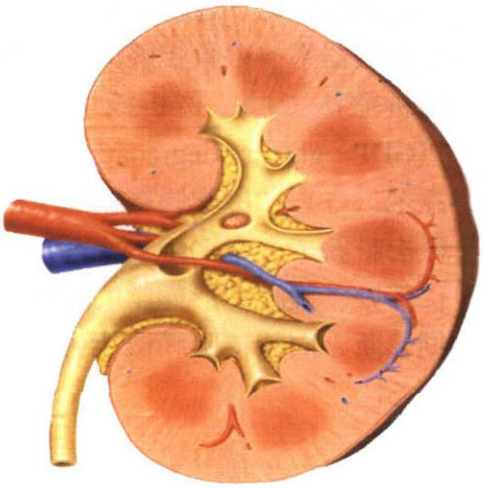


Fig.1-2 左腎の断面

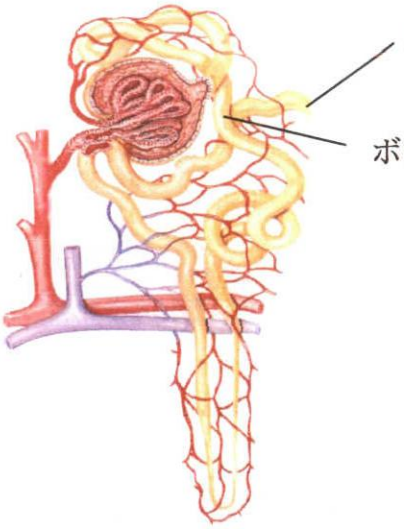


Fig.1-3 ネフロン単位

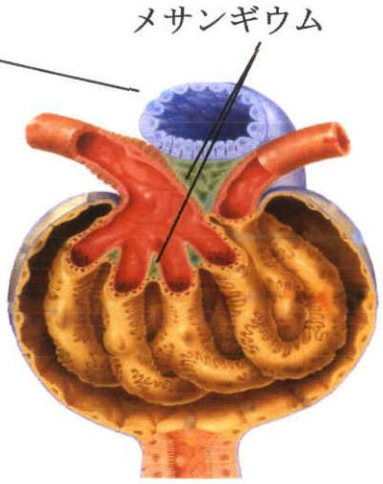


Fig.1-4 腎小体の構造

1-1-2. 腹膜透析[3]

末期腎不全患者に対する対症療法の一つに腹膜透析(Peritoneal Dialysis：略称PD)がある。これは患者自身の腹腔内に高濃度 D-glucose を主成分とした透析液を注入し、腹膜を介して拡散と限外濾過によって水・老廃物(尿として排出されるべき物質)の除去、電解質・pH の調節を行う療法である(Fig.1-5)。血液透析に比べ通院回数が月に 1～2 回と少なく、連続的な老廃物除去による循環器系への負担軽減から社会生活を営む上で有利である。しかし腹膜透析療法では、透析液中に含まれるグルコースやグルコース分解産物（GDP：glucose degradation products）の影響により、溶質透過性亢進や除水不全、さらには腹膜線維症や腹膜硬化症といった合併症を引き起こし、治療を継続できない症例も報告されている[4]。また長期腹膜透析患者の増加に伴い、腹膜の形態学的変化や溶質透過性の亢進等が問題となり、その早期診断と同時に腹膜機能劣化のメカニズムについての解明が急務となっている。

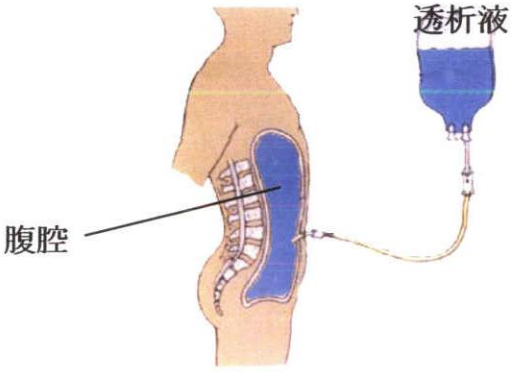


Fig.1-5 腹膜透析[2]

1-1-3. 腹膜組織の分布と構造[5]

腹膜は腹壁の内面を覆う壁側腹膜と腹部臓器(肝臓、膵臓、脾臓、腎臓)とその間膜(大網、胃、腸間膜）を覆う臓壁腹膜からなる漿膜組織で、表面は多くの微絨毛を持つ一層の中皮細胞で覆われており、基底膜下(間質）には弾性繊維、膠原繊維、毛細血管、肥満細胞などで支持されている複合的な膜と定義されている（Fig.1-6)。腹膜の面積は、成人では1.7 ㎡～2.2 ㎡である。腹膜の厚さは50～150μmで、壁側腹膜と臓側腹膜に囲まれた空間を腹腔といい、ここに腹膜透析液が貯留される。

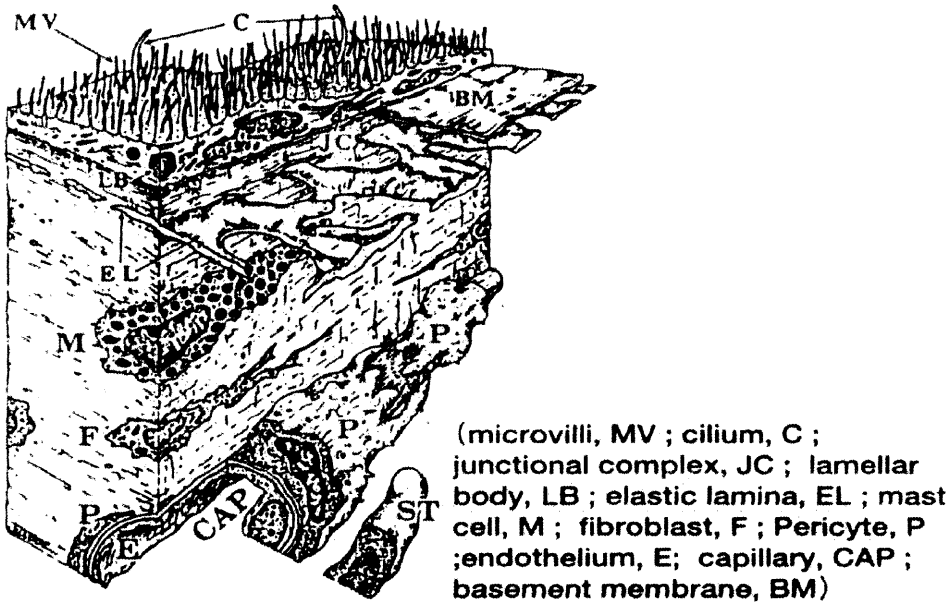


Fig.1-6 正常腹膜の形態学的模式図

1-1-4. 腹膜透析と Epithelial to mesenchymal transition（EMT）

腹膜透析の長期化により、腹膜炎や腹腔内出血が繰り返し引き起こされる。さらには腹膜硬化症や腹膜線維症を引き起こすこともある。腹膜線維症は間質内に存在する細胞が、コラーゲンなどの細胞外マトリックスを過産生する事により間質が線維化することで、さらなる腹膜機能の低下をもたらす[6]。今まではこのような腹膜組織の機能・構造変化は、主に腹膜間質線維芽細胞によって生じているものと考えられてきたが、上皮細胞マーカータンパク質サイトケラチン陽性細胞が間質内で観察されたことから、上皮細胞の関与も議論され始めている[7]（Fig.1-7 茶色：サイトケラチン陽性細胞)。最近では線維症に関係する細胞の起源として以下の三つの説が提案されている。

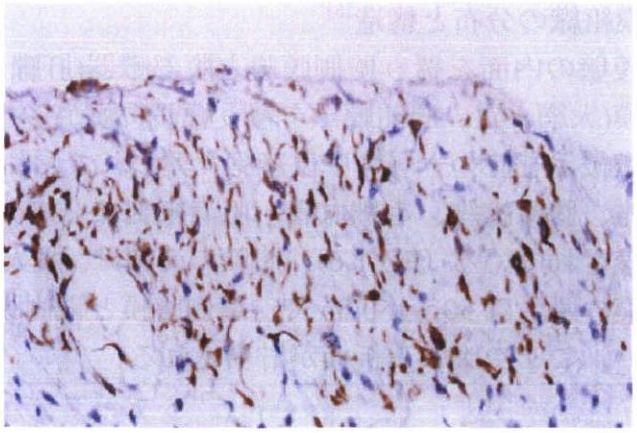


Fig.1-7 間質内での上皮細胞の観察

仮説（1）HPMC が間質へ遊走した細胞由来[7,8]

透析液の高浸透圧や酸性、加熱滅菌時に生じる GDPs（glucose degradation products）の影響で、HPMC は剥離し遊走する。このとき HPMC は EMT（上皮間葉系転換）を引き起こして、細胞間接着を失うことで上皮細胞の極性を失い、間質層へと遊走する。

仮説（2）循環白血球由来[9]

血液中を循環している白血球が、組織障害部位へ遊走することによる影響。

仮説（3）もともと間質に存在する線維芽細胞由来[10]

組織傷害が生じた際に、傷害部位へと遊走し増殖する事で瘢痕形成を促進し、組織修復を行う線維芽細胞によって引き起こされる。この細胞は器官形成後に未分化のまま残った間葉系細胞であると考えられている。

1-2. EMT

1-2-1. EMT とは

1-2-1-1. EMT の機能

EMT は上皮系細胞が間葉系の細胞に形質変化することで、細胞間接着の減少やそれに伴い細胞極性を損失する。すなわち上皮細胞の極性を失うことで、線維芽様細胞へと形質変化する。形質変化した上皮細胞は、細胞遊走能・浸潤能が大きく増加し、また細胞外マトリックス産生も活性化される[6]。上皮細胞のこのような現象は、傷害修復過程や初期胚発生における原腸陥入、神経提細胞の運動や器官形成過程、特に心臓や腎臓、口蓋形成での重要性がこれまでに明らかとなっている[11,12]。また癌細胞の浸潤や線維症との関連も示唆されている[10]。

1-2-1-2.EMT の指標

上皮系細胞が間葉系細胞に形質変化するとき、構造的・機能的に変化するため様々な分子を再構成する必要がある。上皮細胞で持っていた mRNA やタンパク質は維持または減少し、間葉系細胞がもつ特有の mRNA やタンパク質を発現していく。EMT を生じたときに変化する分子マーカーを以下の表にまとめた（table.1-1,1-2)。

Table.1-1 EMT により up-regulate される分子

up-regulate される分子	機能
Snail	転写因子の一つで細胞間接着分子を減少させる。
α-SMA	細胞骨格を形成するタンパク質。
Fibronectin(FN)	細胞接着や遊走に関与する細胞外マトリックス。
Collagen Ⅰ/Ⅲ	間質の主な構成成分である細胞外マトリックス。
ビメンチン	間葉系細胞の中間系フィラメントの構成成分。
MMP-2/9[57]	主にⅣ型コラーゲンを分解する酵素。

Table.1-2 EMT により down-regulate される分子

down-regulate される分子	機能
E-cadherin	Adherence junction を構成するタンパク質。
Occludins	tight junction を構成するタンパク質。
ZO-1	occludins の裏打ちタンパク質。
Desmoplakin	デスモソームの裏打ちタンパク質。
サイトケラチン	上皮細胞の中間系フィラメントの構成成分。

E-cadherin や occludins、ZO-1、desmoplakin は細胞間接着に関与するタンパク質であり、EMT を起こしたときに細胞間接着が解離するために減少する[13]。Snail は遺伝子レベルで細胞間接着をコントロールする転写因子である[8]。α-SMA は細胞骨格を形成するタンパク質で、形態変化に伴い発現する[14]。FN や collagen は間葉系細胞が産生する主な細胞外マトリックスで、形質変化することで産生するようになる。MMP-2/9（matrix metalloproteinase）[57]は細胞外マトリックス分解酵素で主に基底膜の破壊を破壊し、間質へと遊走し始める[15]。サイトケラチンは上皮細胞、ビメンチンは間葉系細胞に特有の中間径フィラメントの構成成分であり、上皮細胞の特性を失い、間葉系の特性を得るために、それぞれ変化する[10]。これらの分子マーカーを測定する事により、EMT が生じたかどうかの判断が可能となる。

1-2-2. EMT を誘導する因子

腹膜線維症と関連した EMT は、多くの growth factor やサイトカイン、ホルモンなどの細胞外物質によって制御されている。現在報告されている EMT を誘導する因子を示した（table.1-3）。その中でも TGF-β1（transforming growth factor）は様々な病的状態において EMT を誘導し、間質線維症を導く因子として特定されており、EMT を誘導する因子としては最も研究が盛んに行われている。腹膜組織においても炎症時には過剰に産生することが報告されている[16,17]。また TGF-β1 だけでなく複数の因子を組み合わせる事により、相乗効果でより EMT が進行することも報告されており、組織中では様々な因子が複雑に相互作用している[15]。

Table.1-3 EMT 誘導因子

分子	特徴・機能	Reference
TGF-β1 (trans forming growth factor)	多くの細胞に対して強い増殖抑制作用を示す。発生や分化にも関与する。	8,15 18,19
EGF (epidermal growth factor)	細胞増殖や遊走、細胞外マトリックス産生など様々な機能を持つ。	15,18
FGF-2 (fibroblast growth factor)	線維芽細胞をはじめとして多くの細胞に対して増殖、分化を促進させる。	20
IL-1 (interleukin)	サイトカインやケモカイン産生を増加させる炎症性サイトカイン。	21
AGEs (advancedglycation end products)	糖からメイラード反応を経て形成される。老化や糖尿病などに関与し、体内では非常に分解されにくい。	22
Type I collagen	間質の主要な構成成分。	18
PDGF (platelet derived growth factor)	胚発生や創傷治癒、炎症時など様々な状況に関与する。血小板や単球などにより産生される。	23

1-3. 細胞遊走

1-3-1. EMT における細胞遊走[10,24]

細胞遊走は様々な状況で起こる細胞運動である。例えば EMT 時の細胞遊走や癌細胞の遊走（転移）、白血球の炎症部位への遊走、傷害修復時における細胞遊走などがある。ここでは特に EMT における細胞遊走を示す。EMT が生じてから細胞が遊走するまでに、大きく分けて 3 段階になる。その模式図を下に示す（Fig.1-8）。

STEP 1

まず初めに細胞間接着を構成する tight junction（occludins や ZO-1）や adherence junction（E-cadherin）の減少によって、細胞間接着が失われる。さらに上皮細胞の apical に存在する微絨毛を失うことにより、細胞極性を

失う。

STEP 2

細胞間接着を失った事により、形態保持が困難になり細胞骨格を形成しているα-SMA を再構成する事で形態変化し始める。またこのときα-SMA というストレスファイバーの形成だけでなく、仮足や接着斑を形成することで、細胞は前後の極性を獲得して遊走し始める。

STEP3

最終段階として細胞外マトリックス分解酵素 MMP を産生する事により基底膜を破壊し、さらには間質を構成している I 型 collagen を分解しながら浸潤していく。

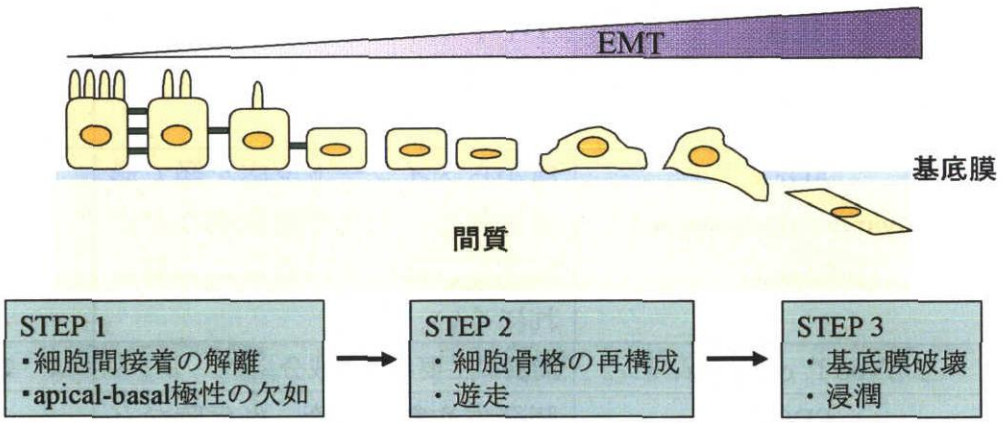


Fig.1-8 EMT による細胞遊走

1-3-2. 化学走化性因子

化学走化性因子は EMT 細胞を遊走させるだけでなく、癌細胞の遊走や傷害修復時における上皮細胞の遊走、炎症時における炎症細胞・線維芽細胞の遊走など様々な状況において機能する。細胞は様々な化学走化性因子が存在する中で、レセプターを介して遊走のシグナルを細胞内に伝え、より強い機能を持った因子を認識し、方向性を持って目的とする部位へと遊走すると考えられている[25]。化学走化性因子として考えられている因子及びそれに対するレセプターを以下にまとめた（table.1-4）。

Table.1-4 化学走化性因子

分子	レセプター	機能	Reference
FN (fibronectin)	Integrin α 5 β 1 Integrin α v β 1	主に線維芽細胞が産生する、接着や遊走に関与する細胞外マトリックス。	19,26 27,28
PDGF	PDGFR1 PDGFR2	胚発生や創傷治癒、炎症時など様々な状況に関与する。血小板や単球などにより産生される。	29
IL-8	GPCR	好中球の遊走に関与するケモカイン。	30 31
TGF-β	TGFR	多くの細胞に対して強い増殖抑制作用を示す。発生や分化にも関与する。	15,18
FGF	FGFR1~4	線維芽細胞をはじめとして多くの細胞に対して増殖、分化を促進させる。	20
EGF	HER1/ErB1	細胞増殖や遊走、細胞外マトリックス産生など様々な機能を持つ。	15 18 32
VEGF (vascular endothelial growth factor)	VEGFR1~3	主に血管内皮細胞の増殖や血管透過性亢進因子として機能する。	33
HA (hyaluronan)	CD44 RHAMM	グリコサミノグリカンの一種で様々な細胞動態に関与する。	34

上記以外にも化学走化性因子としてはケモカインファミリーがある。ケモカインとは細胞遊走を主要な作用とするサイトカインの一群であり、炎症反応、免疫応答などの生命維持活動に極めて重要な役割を担っている。ヒトでは約 45 種類のケモカインが同定されている。

1-4. フィブロネクチン(FN)と α5β1-integrin

1-4-1. FN の構造とその機能

FN の役割は細胞接着性の糖タンパクで、胚形成、創傷治癒、ガン転移や線維化、血栓形成など多くの役割を果たしている。FN は通常では肝臓で合成され、可溶性のタンパク質として血漿中に高濃度で存在しており、また創傷時及び止血時においては局所的に多量に存在する。

FN の構造は、分子量約 40~50kDa の糖タンパク質であり、3 種類のタイプ(Fn Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ)の繰り返しモジュールで構成されており、2 本のよく似たサブユニットがジスルフィド結合でつながった構造をしている[52][53][54][55](Fig.1-9)。

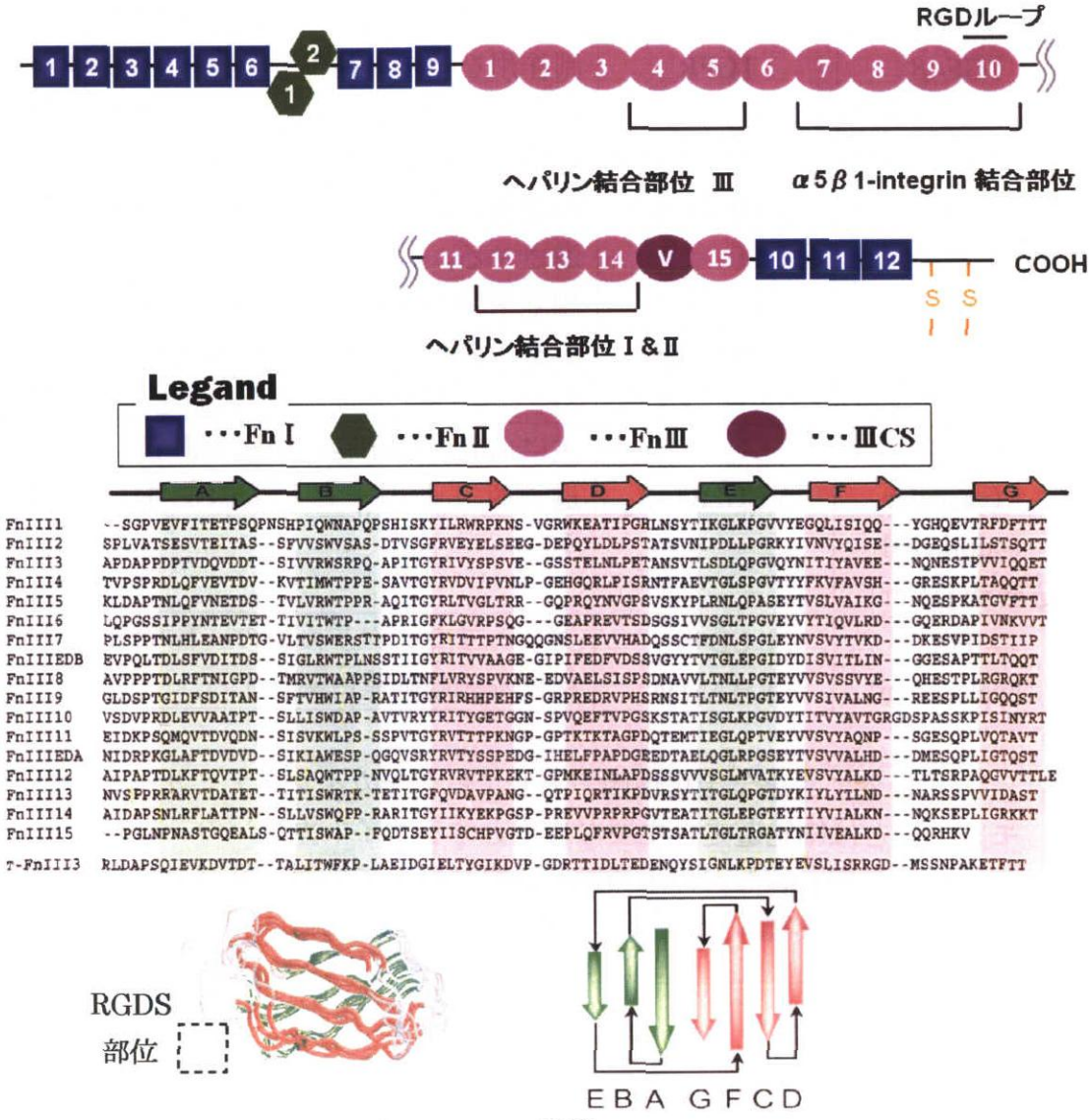


Fig.1-9 FN の構造

前記の図は、FN の模式図および各モジュールのシークエンス(FnⅢリガンドのみを示す)とそのモジュールの模式図を示したものになる[55]。

各モジュールは模式図に示してあるように折りたたまれている形をしており(左下図)、N 末端から始まり C 末端へとつながっている(A⇒B⇒・・・G というフラグメント)。この模式図の緑色で示された部位は、モジュールの後ろ、赤色で示された部位は手前にあることを示しており、各シークエンスにそれぞれ色分けで表示をしている。また FN の構造はシークエンス内の緑(A、B、E)、赤(C、D、G、F)でそれぞれβシートを形成しており、色づけされていないシークエンスでループ構造となっている。

このような構造をしている FN においてもっとも主要な役割を果たしている部位が、リガンド FnⅢの部位である。とくに FnⅢ4-5 及び FnⅢ12-14 はヘパリン結合部位として細胞表面のプロテオグリカン(PG)と作用し、また FnⅢ7-10 特に FnⅢ10 に含まれている FN において最も特徴的なループ構造をしている RGDS[59](Arginine-Glycine-Aspartic acid-Serine)は integrin と作用し、細胞遊走に関与するシグナル伝達を行うことが知られている。

1-4-2. integrin と細胞外マトリクスの関係と役割

細胞は integrin を介し様々な細胞外マトリクスと結合する。インテグリンは 140~200kDa のα鎖と 90~110kDa のβ鎖が 1:1 のヘテロ二量体で、現在までにα鎖 18 種類、β鎖 8 種類の 24 種類が確認されている。作用する細胞外マトリクスはα鎖及びβ鎖の組み合わせによって変化し、RGDS 受容体、コラーゲン受容体、ラミニン受容体、白血球特異的受容体の 5 種類によって分類される(Fig.1-10)。

このような特徴を持った integrin は対応する細胞外マトリクスによって細胞の増殖、接着および遊走に関与することが知られている。

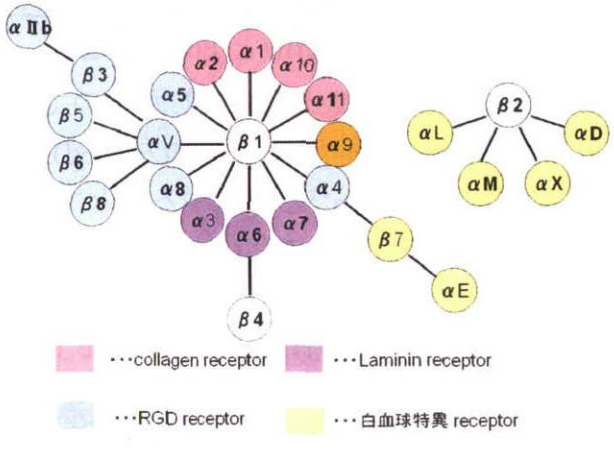


Fig.1-10 integrin と ECM の相関図

このようにintegrinは様々なECMと接着することができる。

1-4-3. α5β1-integrinとFNの関係と役割

FNと結合するintegrinはRGDを認識、結合できるサブユニットを持っている。なかでも、もっとも一般的なものがα5β1-integrinである。integrinは、α鎖、β鎖のヘテロ二量体で、それぞれのサブユニットの違いにより名前をつけられているものの、基本的な構造は同じである[60][61][62][63](Fig.1-11)。

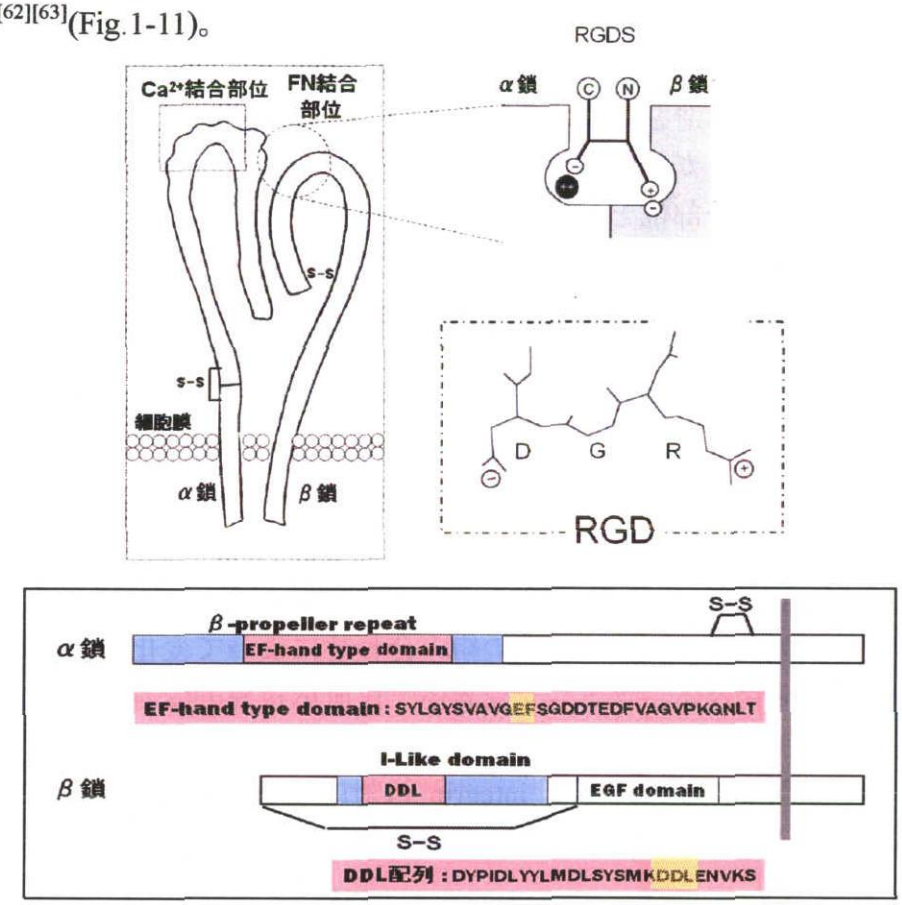


Fig.1-11 integrinとFNの接着

この図はα5β1-integrinの模式図を示したものである。この模式図について説明するとintegrinは膜貫通型の受容体(左上図)で、α鎖にCa^{2+}結合部位を持っている。この部位がCa^{2+}と結合することでα鎖の一部が正の電荷を帯び、これによりFNのFnⅢ10に存在するRGDと結合し(右上図)、細胞膜下のチロシンをリン酸化、シグナル伝達が起こると考えられている。このRGDと結合する部位はα鎖の方はEF-hand type domainといわれ、β鎖はDDL配列と呼ばれている(下図)。

このようにα5β1-integrinはFNのRGDS領域と結合し、チロシンをリン酸化しシグナル伝達を行っている。このようにFNはintegrinと作用するこ

とがしられているが、最近の研究から Syndecan といわれるレセプターとも結合することが明らかになってきている。

1-4-4. Syndecan と FN の関係と役割

Syndecan は細胞表面に存在するプロテオグリカンで、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(Heparan sulphate proteoglycan:HSPG)とコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(Chondroitin surface proteoglycan:CSPG)の対で構成されている[53][54] (Fig.1-11)。

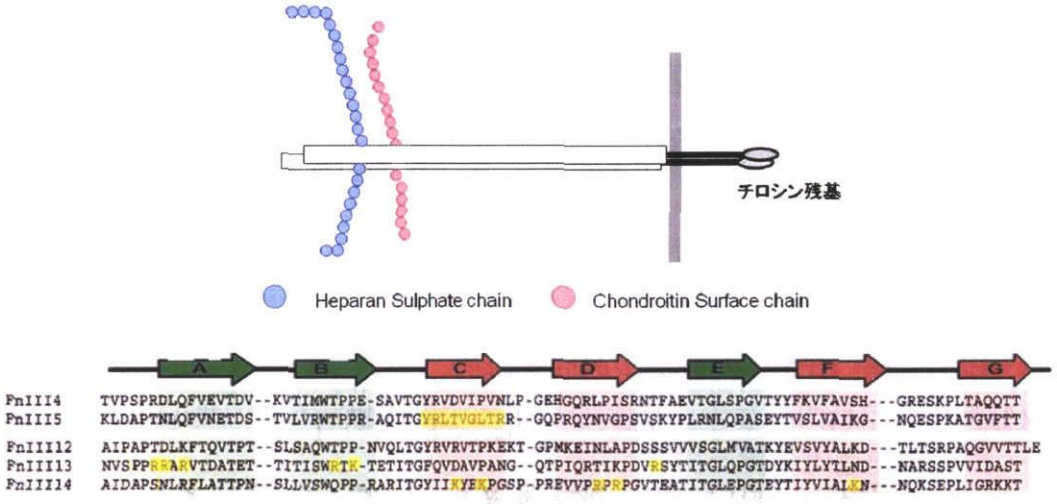


Fig.1-12 Syndecan の構造(上図)と FN の構造(下図)

このような構造を持っている Syndecan は、ヘパラン硫酸もしくはコンドロイチン硫酸鎖が、FN の FnⅢ4-5(YRLTVGLTR シークエンス)または FnⅢ12-14 内の HBS-1(Heparin-binding-site-1:図中イエローマーカー部位)または HBS-2 といわれるヘパリン結合部位と結合することで、細胞内のチロシン部位が活性化し、シグナル伝達を引き起こす[64]。この syndecan と結合する FN のヘパリン結合部位について詳しく説明すると、FnⅢ4-5 の YRLTVGLTR や FnⅢ12-14 内に存在する HBS-1(FnⅢ13 内の黄色の部位)もしくは HBS-2(FnⅢ14 内の黄色の部位)は、ABE や CDGF(Fig.1-9 左下図)といった同一のβシート上に存在し、syndecan と結合している。

以上のように FN はα5β1-integrin もしくは Syndecan を介することで遊走に関与することが知られており、EMT 誘導により起こる細胞の遊走にも関与が考えられる。最近の研究でもガンの浸潤の原因に FN が関与しているのではないかと考えられている。

2. 目的

HPMC の EMT は腹膜線維症に関係していると考えられているが、その詳しいメカニズムはまだ解明されていない。特に EMT を起こした HPMC がどのように間質へと遊走するのかはわかっておらず、そのメカニズムを解明できれば、腹膜線維症の予防や治療法の開発に貢献できる。

そこで「炎症等によって間質中に生じた化学走化性因子の濃度勾配に対して、EMT を起こした細胞が遊走する」という仮説を立てた。

この仮説を基に、

(1) TGF-β1 曝露による HPMC の形態変化の観察及び mRNA 測定からの EMT 誘導の確認

(2)EMT 誘導 HPMC が化学走化性因子の濃度勾配を認識して遊走することを in vitro 実験系で実証

(3)EMT 誘導 HPMC の遊走の原因を証明

(4)またその証明のために従来の三次元遊走評価法をより改良した新しい三次元細胞遊走装置を試作

以上の四つを目的とした。

3. 方法

実験の概要

具体的な研究項目は以下に記す。

Ⅰ. EMT 誘導確認実験

① TGF-β1 曝露による腹膜中皮細胞(HPMC)の形態変化の動画観察

② TGF-β1 曝露による HPMC の Snail 及び E-cadherin mRNA の発現測定

Ⅱ. 三次元遊走実験

③ 化学走化性因子 FN に対するレセプターα5-integrin mRNA 及び collagen 分解酵素 MMP-2 mRNA の発現の測定

④ EMT 誘導なし及びありの三次元遊走モデルによる EMT 誘導細胞の遊走の定量化

⑤ FN gradient を組み込んだ三次元遊走モデルによる EMT 誘導細胞の遊走の定量化

⑥ α5-integrin 阻害剤である RGDS を用いた際の三次元遊走モデルによる EMT 誘導 HPMC の遊走の定量化

⑦ 三次元遊走モデル条件における細胞増殖試験

⑧ EMT 誘導 HPMC において FN 添加および RGDS 阻害時のα-SMA の発現量の測定(ウェスタンブロット)

3-1. 実験系の作成

ヒト腹腔内体網から採取した腹膜中皮細胞を培養して、以後の実験を行った。ヒト体網からの腹膜中皮細胞の採取（初代培養）及び継代培養は生体材料化学研究室の共通プロトコル（APPENDIX A-1. 細胞培養プロトコル 参照）に従った。ここではその概略を記す。

3-1-1. ヒト大網由来腹膜中皮細胞（HPMC）の培養

本研究で使用した HPMC は、予め本学医学部倫理委員会によって患者組織の採取につき承認を得て、informed consent を得た患者からいただいた体網組織に由来する。腹腔内手術から得られたヒト体網塊を親指大の切片に切り分けた。10%trypsin/PBS 溶液により HPMC を単離・採取し、各種 supplement 及び 10%FBS を添加した M199 を用いて培養フラスコ内で培養した。本研究では継代数が 2~3 代目の細胞から細胞密度が 5×10^5 個/ml の細胞懸濁液を作成し、6 穴プレート及びφ35 シャーレ、24 穴プレートに播

種した後、confluent または subconfluent まで培養したものを使用した。培地は 3 日に 1 回交換した。

3-1-2. HPMC への TGF-β1 誘導

6 穴プレート及びφ35 シャーレに subconfluent まで培養した HPMC の培地を、0.1%FBS/M199 と交換し 24h growth arrest を行った。その後 10ng/ml TGF-β1/M199 と交換し、12、24、48h 培養した。

3-2. TGF-β1 誘導による細胞形態変化の観察（動画撮影及び静止画撮影）

動画撮影

φ35 シャーレに培養した HPMC に TGF-β1 を誘導後、倒立型位相差顕微鏡 IX50(OLYMPUS, Tokyo, Japan)にセットし(Fig.1-1)、取り付けた MOS により画像を X-cap にて保存した。画像取り込みを 1 枚/10 分行い、72h まで行った。保存した画像を画像処理ソフト Virtual Dub(Ver.1.617 著作 Avery Lee 氏)を利用して動画作成を行った。

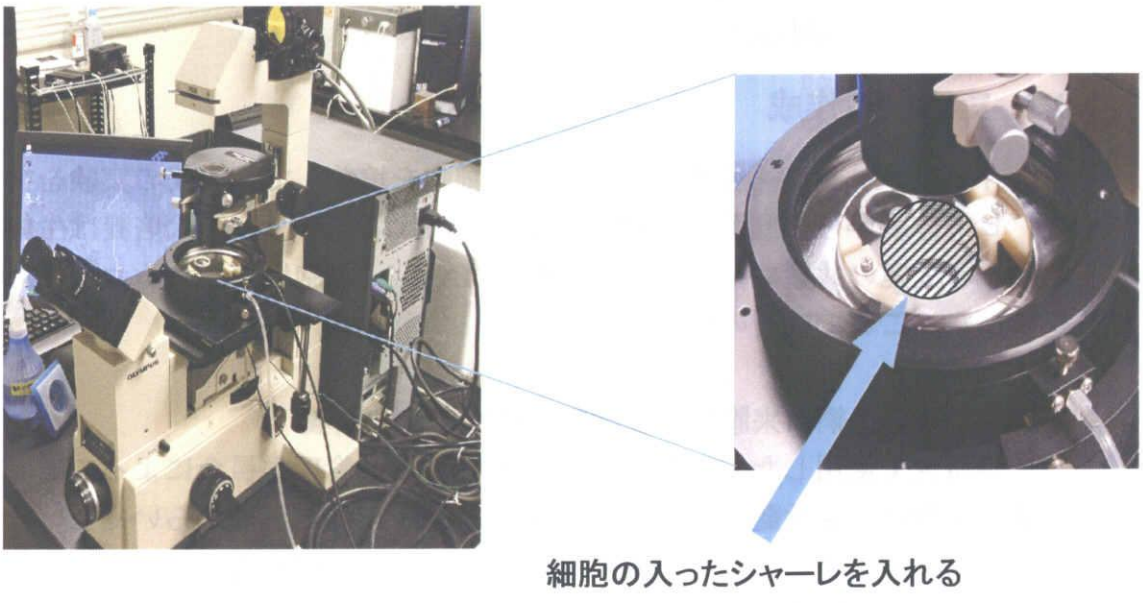


Fig. 3-1 シャーレの設置場所

静止画撮影

TGF-β1誘導後、各時間（0、24、48h）におけるHPMCの形態を位相差顕微鏡CK2にて観察し、デジタルカメラCAMEDIA C-3040 ZOOMにてその画像を撮影し、パーソナルコンピューターに取り込んだ。

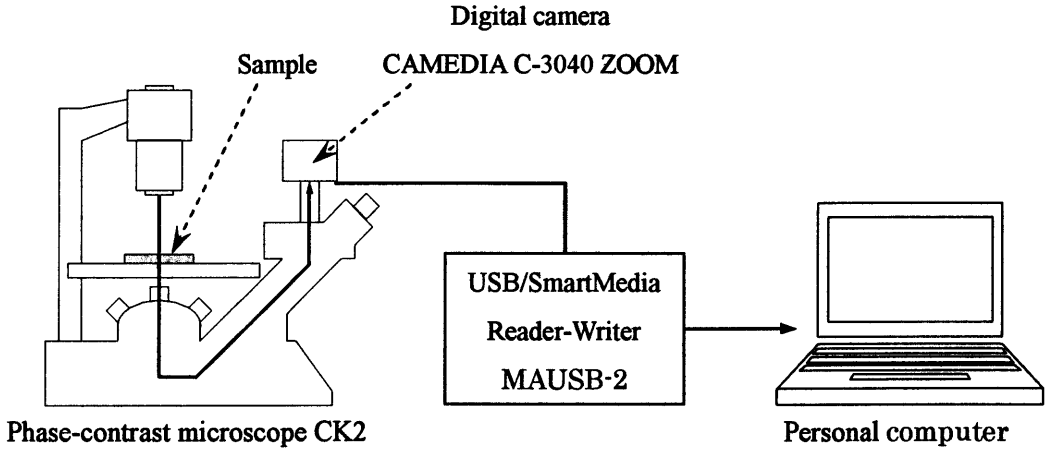


Fig. 3-2 画像取り込みダイアグラム

3-3. TGF-β1 誘導による Snail 及び E-cadherin、α5-integrin、MMP-2 mRNA の経時的測定

作成したHPMCのTGF-β1誘導モデルより、mRNAの抽出し、Snail及びE-cadherin、α5-integrin、MMP-2 mRNA発現量の経時的測定を行った。AGPC法、RNAの定量法、RT-PCR法、電気泳動法は生体材料化学研究室の共通プロトコル（APPENDIX A-3. AGPC法プロトコル、A-3. RNAの定量プロトコル、A-4. RT-PCRプロトコル 参照）に従った。ここでは、簡単にその概要を記す。

3-3-1. Acid Guanidium-Phenol-Chloroform 法（AGPC 法）によるmRNA の抽出と定量

作成したHPMCのTGF-β1刺激モデルにRNA-Bee™ ISOLATION OF RNAを1ml/well加え細胞を掻き取った。chloroform - isoamylalcohol 24:1を200μl加え15分間静置した（室温）。12000G/4℃/15分にて遠心分離、最上層より350μl採取し、isopropanolを500μl加え-80℃にて一晩保存した。解凍後12000G/4℃/10分にて遠心分離、上澄を除去し、75%EtOH/DEPC処理水溶液を500μl加えた。10000G/4℃/5分にて遠心分離、再び上澄を除去

し、減圧乾燥後 DEPC 処理水を 10μl 加え、55℃/5 分加温後 4℃に冷却した。Smart Spec™ 3000 Spectrophotometer を用いて各サンプルの mRNA を定量した。

3-3-2. mRNA の逆転写による cDNA 作成と Polymerase Chain Reaction (PCR)による Snail 及び E-cadherin、α5-integrin cDNA の増幅

mRNA の定量結果を基に、全サンプルの mRNA 濃度を統一した。これらの mRNA を Super Script™ RNase H⁻ Reverse Transcriptase 及び Random Primers を用いて cDNA に逆転写した（RT product の作成)。得られた RT product 2μl と、各種 Primer(Table.3-1)及び AmpliTaq Gold™ DNA polymerase を含む PCR Master Mix を 48μl 混合し、サンプル内の cDNA を PCR により増幅させた（PCR product の作成)。等量の cDNA が用いられているかを確認し、PCR product を半定量化するため、内部標準として house keeping gene である GAPDH を用いた。

Table.3-1　Primer List

Primer	Sequence		Cycles	Size (bp)
GAPDH	sense	5'-GAT GTC ATC ATA TTT GGC AGG TT-3'	29	322
	antisense	5'-CCT GCA CCA CCA ACT GCT TAG CCC-3'		
Snail	sense	5'-TCA GAC GAG GAC AGT GGG AAA G-3'	38	487
	antisense	5'-GCT TGT GGA GCA GGG ACA TTC-3'		
E-cadherin	sense	5'-TCC CAT CAG CTG CCC AGA AA-3'	36	500
	antisense	5'-TGA CTC CTG TGT TCC TGT TA-3'		
α5-integrin	sense	5'-GGC ATC AGA GGT GGC TGG AGG CTT-3'	39	453
	antisense	5'-GGC AGC TAT GGC GTC CCA CTG TGG-3'		
MMP-2	sense	5'-ACA GCC TGG CAT GGG GCA AGT -3'	29	292
	antisense	5'-TTC TCC TCC ATC CAG TGG AG-3'		

3-3-3. 電気泳動とバンドの定量

PCR による増幅後、3% wt/vol Agarose gel と、0.3μg/ml の ethidium bromide を含む 600ml の 1x Tris-acetate-EDTA buffer 泳動液を用い、80V/80mA/70 分の条件で PCR product 10μl の電気泳動を行った。泳動後、イメージアナライザーにて jpeg 型式でゲルの画像を撮影し、画像解析ソフト Gel-Pro® Analyzer Version 3.1 for Windows™を用いてバンドの輝度を定量化した。結果は GAPDH の値に対する Snail 及び E-cadherin、α5-integrin の値の比とし

て示した。

3-4. 化学走化性因子を用いた EMT 細胞の三次元細胞遊走評価

具体的な方法は APPENDIX. A-6　三次元細胞遊走モデルの作製　に従った。ここでは簡単な方法を示す。

3-4-1. EMT 誘導なし及び EMT 誘導における三次元細胞遊走評価モデルの作成

24 穴プレートに 10μg/ml FN を含んだ 1.5mg/ml collagen gel を 200μl 加え、37℃/30 分インキュベートしてゲル化させた（control として 1.5mg/ml collagen gel を用いた）。さらにそのゲルの上に、0.5mg/ml collagen gel を 200μl 加え、37℃/30 分インキュベートしてゲル化させることにより、FN の拡散層を作成した。FN は 48h、72h インキュベートして濃度勾配を作成した。またゲル上に膜孔 12μm のインサートを乗せ、EMT 誘導なしでは 0.1%FBS/M199 で、また EMT 誘導条件として 10ng/ml TGF-β1/0.1%FBS/M199 を 300μl 加えた（Fig.3-3a）。

予めφ35 シャーレに subconfluent まで培養し、EMT 誘導条件のときのみ HPMC に 10ng/ml TGF-β1 を 48h 曝露した。それを継代操作し、細胞数が 5×10^4 個/穴となるように作成しておいた 24 穴プレートのインサート上部へ播種後、72h 培養した（Fig.3-3b、Fig.3-3c）。

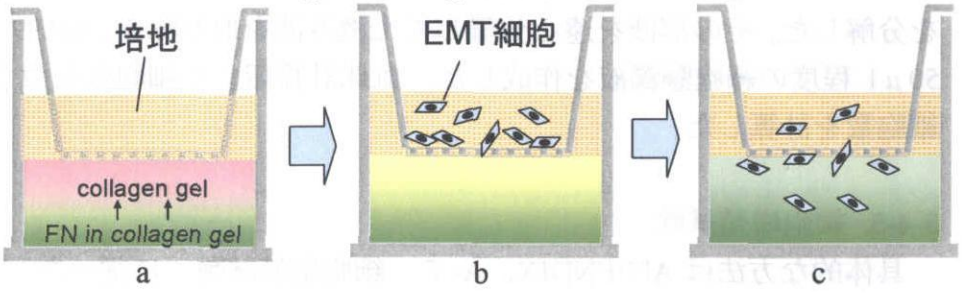


Fig.3-3 三次元細胞遊走評価モデル

3-4-2. FN 及び BSA を用いた三次元細胞遊走評価モデルの作製

3-4-1 の実験と同じように 24 穴プレートに、1.5μg/ml BSA を含んだ 1.5mg/ml
collagen gel を 200μl 加え、37℃/30 分インキュベートしてゲル化させた。また同じように上層に 0.5mg/ml collagen gel を 200μl 加え、37℃/30 分インキュベートしてゲル化させることにより、FN 及び BSA の拡散層を作成した。FN の濃度勾配と一致させるために、BSA の拡散時間はそれぞれ 16h、24h インキュベートしてそれぞれの濃度勾配を作成した。

遊走実験に使用した細胞は EMT 誘導条件の細胞を用い 3-5-1 と同条件で

実験に用いた。

3-4-3. RGDS 阻害剤による FN 存在下での実験条件

FN のゲル内の濃度及び拡散時間等は 3-5-1 に記した。

RGDS による阻害実験では、まず予めφ35 シャーレに subconfluent までに培養した細胞に 10ng/ml TGF-β1 を 48h 曝露した。それを継代操作する際に、5μg/ml の RGDS を曝露し、30min インキュベートを行った。その後継代培養するときに、細胞数が 5×10^4 個/穴となるように作成しておいた 24 穴プレートのインサート上部へ播種後、72h 培養した。

3-4-4. 遊走細胞数の計測

以上の実験条件で行った三次元遊走細胞の測定方法について以下に記す。

まず三次元遊走実験に用いた培地を取り出し、そこに PBS をいれ、PBS を取り除いた培地と混ぜ、上澄みとした。その後インサートを取り除き、インサートは風乾し、ディフクイック染色(APPENDIX 参照)により細胞数を測定した。また上澄みは遠心分離して溶液を取り除き、M199 の 50μl 程度細胞懸濁液を作成した。血球計算盤にて細胞数をカウントし、細胞数を計算した。

ゲルに collagenase S-1 を 30μl 加え、37℃/30 分インキュベートしてゲルを分解した。その溶液を遠心分離して上澄み液を取り除き、M199 を加えて 50μl 程度の細胞懸濁液を作成した。血球計算版にて細胞数をカウントし、細胞数を計算した。

3-4-5. 細胞増殖試験

具体的な方法は APPENDIX. A-7　細胞増殖試験　に従った。ここでは簡単な方法を示す。

φ35 シャーレに HPMC を 5×10^4 個播種した。10%FBS/M199 で 24h インキュベートし、細胞を接着させた。その後 0.1%FBS/M199 で 24hgrowh arrest 行い、各シャーレごとに以下に示す条件で培養を行った。

- 10%FBS/M199
- 0.1%FBS/M199
- 0.1%FBS/M199 + 10ng/ml TGF-β1
- 0.1%FBS/M199 + 10ng/ml TGF-β1 + 10μg/ml FN

培養 24h ごとに 96h まで各シャーレの同一箇所を写真撮影し、細胞数をカウントした。

3-5. 三次元遊走実験条件下でのα-SMA のウェスタンブロット測定

三次元遊走モデル条件下で培養した HPMC より、

- 0.1%FBS/M199
- 0.1%FBS/M199 + 10ng/ml TGF-β1 (24h 曝露)
- 0.1%FBS/M199 + 10ng/ml TGF-β1 (24h 曝露)
  ⇒10μg/ml FN(24h 曝露)
- 0.1%FBS/M199 + 10ng/ml TGF-β1 + 10μg/ml FN
  ⇒5μg/ml RGDS 添加 (30min インキュベート)
  ↳ その後　10μg/ml FN(24h 曝露)

タンパク質を抽出し、α-SMA 発現量の経時的測定を行った。タンパク質の抽出法及び BCA 法によるタンパク質の定量、SDS-PAGE、ウェスタンブロッティング、抗体反応とバンドの定量は体材料化学研究室の共通プロトコル（APPENDIX. A-6 ウェスタンブロット法　参照）に従った。ここでは、簡単にその概要を記す。

3-5-1. タンパク質の抽出と BCA 法による定量

上記の実験条件の細胞に、細胞溶解液を 300μl 加え、さらに protease inhibitor 及び phosphatase inhibitor をそれぞれ 2μl ずつ加えた。室温で 15 分ほど軽く浸盪した後、セルスクレーパーで細胞を掻き取った。冷却遠心機で 15000rpm/30 分遠心し、上澄み液を取った。抽出したタンパク質溶液は -20 度で冷凍保存した。

A 溶液と B 溶液を 50:1 で混合したもの 100μl に対して、サンプル及びスタンダード（BSA）を 10μl ずつ加えた。37℃/30 分静置し、OD_{562} を測定した。スタンダードのタンパク質濃度を横軸、吸光度を縦軸にとり、検量線を作成した。その検量線を元にサンプルの総タンパク質濃度を測定した。

3-5-2. SDS-PAGE によるタンパク質の分離

ゲル板に running gel（10%アクリルアミドゲル）と stacking gel（4.5%アクリルアミドゲル）溶液を加え、コームを取り付けて 30 分間静置してゲル

化させた。コームを取り外し、ウェルを作成した。泳動バッファーを満たした電気泳動槽にゲル板を固定した。抽出したタンパク質溶液とサンプルバッファーを1:1で混合し、熱湯100℃/3分でボイルした。各ウェル内にサンプルを40μl程度及び分子マーカーを5μlゆっくりと注入した。15mA/2時間泳動を行った。

3-5-3. 膜への転写（ウェスタンブロッティング）

電気泳動終了前にrunning gelと同じ大きさに切ったPVDF膜をメタノールに20秒浸し、さらにB溶液に30分浸盪させた。またrunning gelと同じ大きさに切ったブロッティング濾紙をA溶液に2枚、B溶液に1枚、C溶液に3枚浸した。電気泳動終了後、running gelをB溶液に浸した。ブロッティング装置に、準備していたA溶液に浸していたブロッティング濾紙2枚を乗せ、さらにB溶液に浸していた濾紙1枚、PVDF膜、running gel、C溶液に浸していた濾紙3枚の順番に上に重ねてセットした。72mA/40分ブロッティングした。ブロッティング後PVDF膜をブロッキング液に浸し、over nightブロッキングした。

3-5-4. 抗体反応とバンドの定量

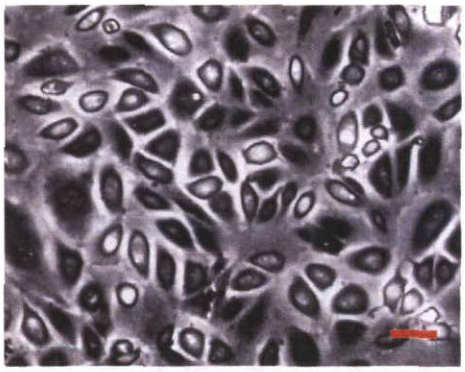
α-SMA一次抗体溶液をPVDF膜に添加して、室温下で1時間静置した。その後PBSTで10分毎に3回洗浄した。洗浄後二次抗体をPVDF膜に添加して室温下で1時間静置した。再びPBSTで10分毎に3回洗浄した。

ECL1液と2液をそれぞれ750μlずつ混ぜ、PVDF膜上に添加し、1分間静置した。Typhoon でバンドをスキャンし画像を保存した。保存した画像をImage Quantで定量を行った。

4. 結果

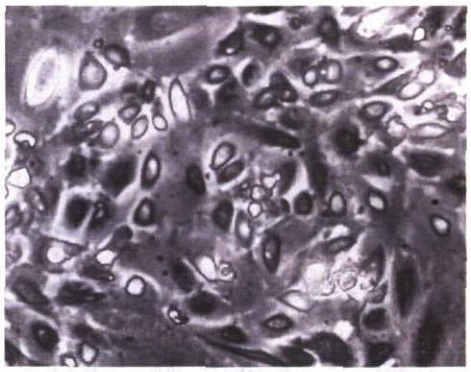
4-1. TGF-β1 誘導による細胞の形態変化の観察

Subconfluent に培養した HPMC に 10ng/ml TGF-β1 誘導したときの、細胞形態の経時変化を、デジタルカメラにより撮影した画像を示す（Fig.4-1）。TGF-β1 誘導直後（0h）では細胞間接着がしっかりしており、敷石状の形態であった。TGF-β1 の誘導時間の経過にしたがって、細胞間が離れ形態が紡錘状に細長く変化した。

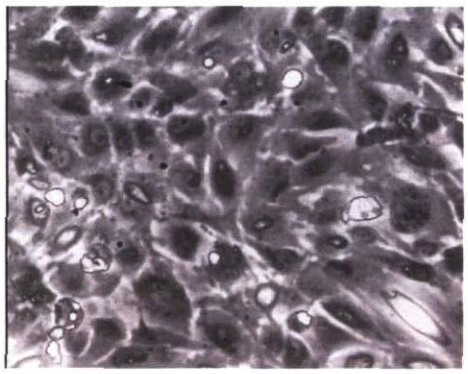


0h

Scale:250μm



24h



48h

Fig.4-1 TGF-β1 誘導による HPMC の形態変化（scale:250μm）

4-2. TGF-β1 誘導による細胞の遊走距離の測定

Subconfluent に培養した HPMC を 0.1%FBS/M199 で 24h growth arrest を行い、10ng/ml TGF-β1 曝露し、10 分毎に撮影を行った。撮影した写真を APPENDIX で記した Image J を使い、細胞の遊走距離を 1h 毎に測定し、6h 毎に平均を取った。TGF-β1 の曝露によって 4-1 で記したように、細胞の形態変化が見られ、曝露後 24-36h で遊走距離が最大となった(n=20)(Fig.4-2)。

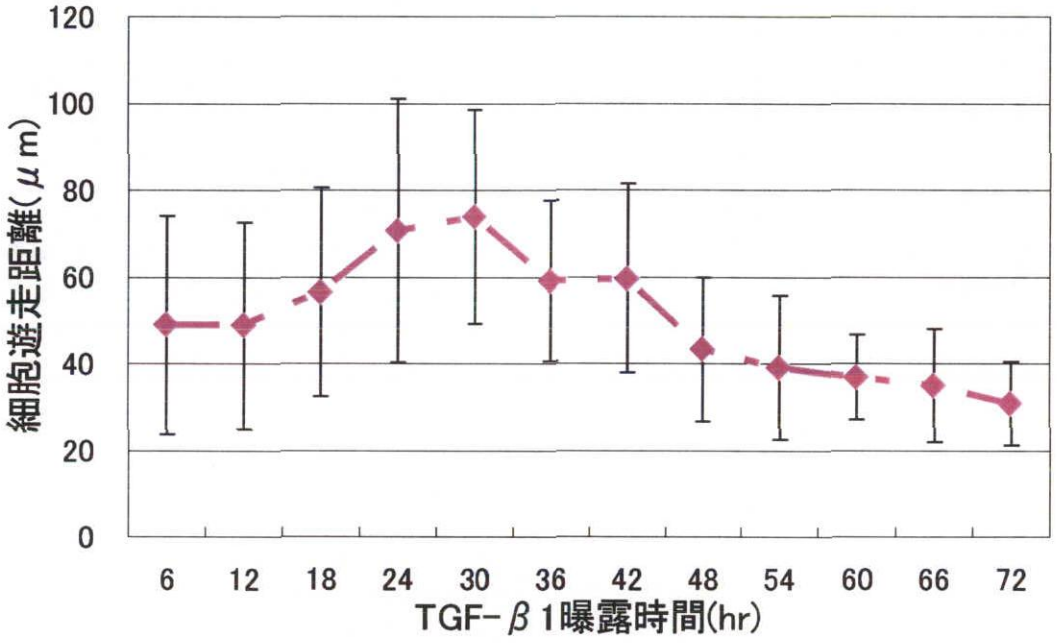


Fig.4-2 TGF-β1 誘導による HPMC の遊走距離

4-3. TGF-β1 誘導による Snail 及び E-cadherin、α5-integrin、MMP-2 mRNA の経時的測定

以下に示す Snail 及び E-cadherin、α5-integrin、MMP-2 mRNA 発現結果に用いた値は、RT-PCR 法によって測定したそれぞれの発現量を、内部標準である GAPDH mRNA の発現量で除し、control が 1 となるように補正を行った。

4-3-1. TGF-β1 誘導による Snail mRNA の経時的測定

Fig.4-3 に TGF-β1（10ng/ml）誘導に対する Snail mRNA 発現の時間変化を示す。TGF-β1 の誘導後から Snail mRNA 発現は増加した。また誘導 24 時間後で最大となり、control の約 1.8 倍の発現を示した。48h ではやや減少したが、control よりも高い発現レベルを維持していた（n=8）。

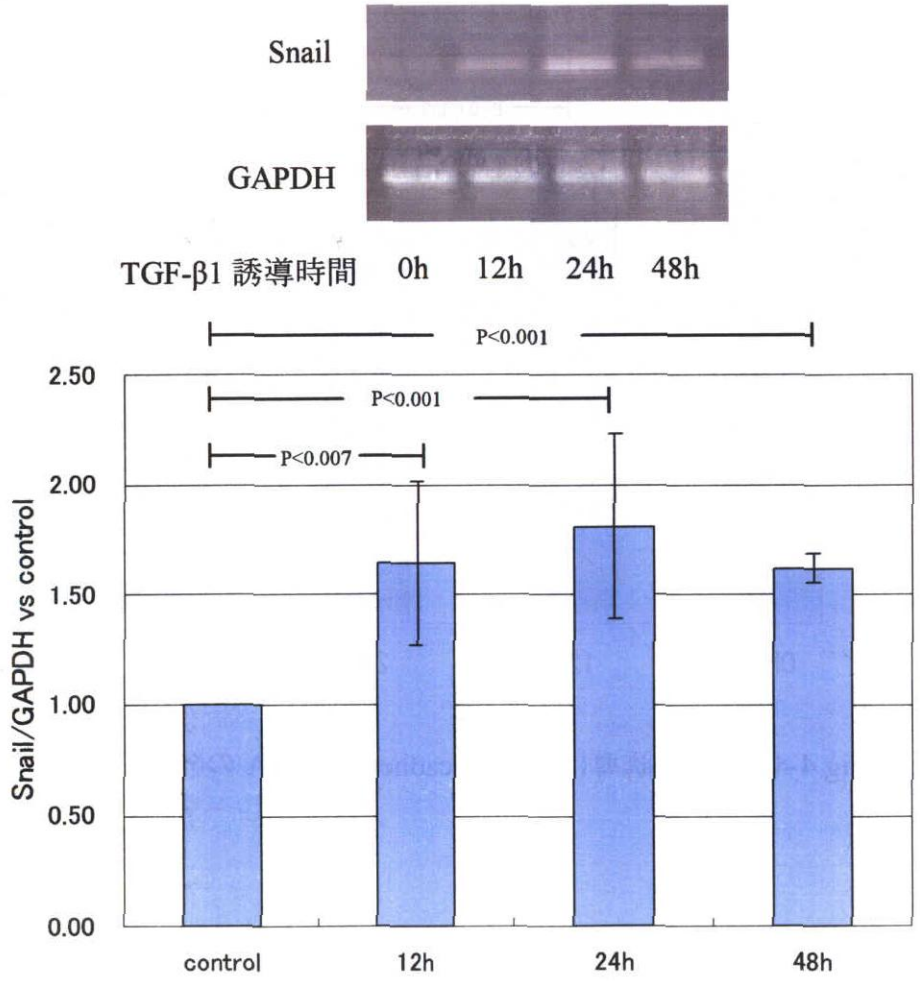


Fig.4-3 TGF-β1 誘導による Snail mRNA の経時変化

4-3-2. TGF-β1 誘導による E-cadherin mRNA の経時的測定

Fig.4-4 に TGF-β1（10ng/ml）誘導に対する E-cadherin mRNA 発現の時間変化を示す。誘導に対して E-cadherin mRNA は時間依存的に減少した。また誘導 48 時間後では control の約 0.7 倍の発現の減少を示した（n=8）。

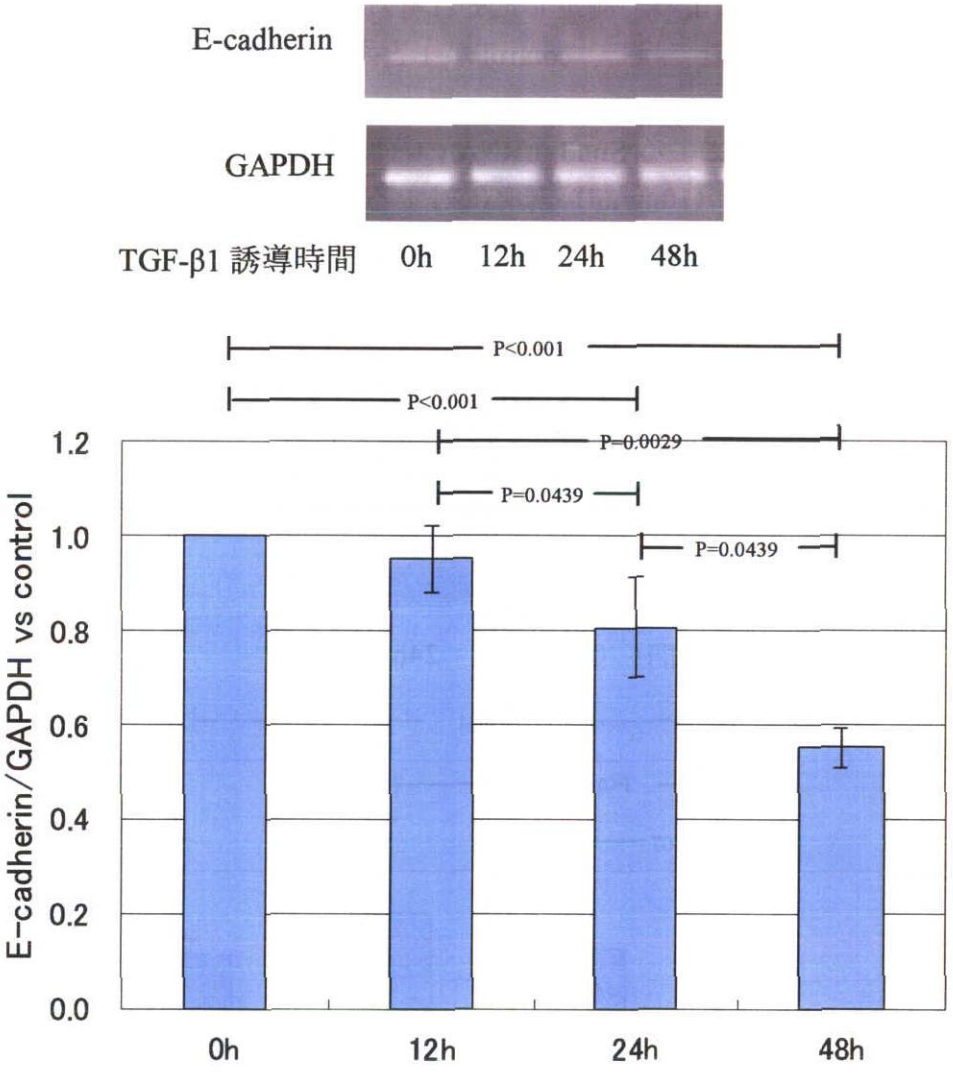


Fig.4-4 TGF-β1 誘導による E-cadherin mRNA の経時変化

4-3-3. TGF-β1 誘導による α 5-integrin mRNA の経時的測定

Fig.4-5 に TGF-β1（10ng/ml）誘導に対する α 5-integrin mRNA 発現の時間変化を示す。TGF-β1 誘導に対して α 5-integrin mRNA は 12h の時点から強い発現を示し、48h でもその強い発現を維持していた（n=12）。

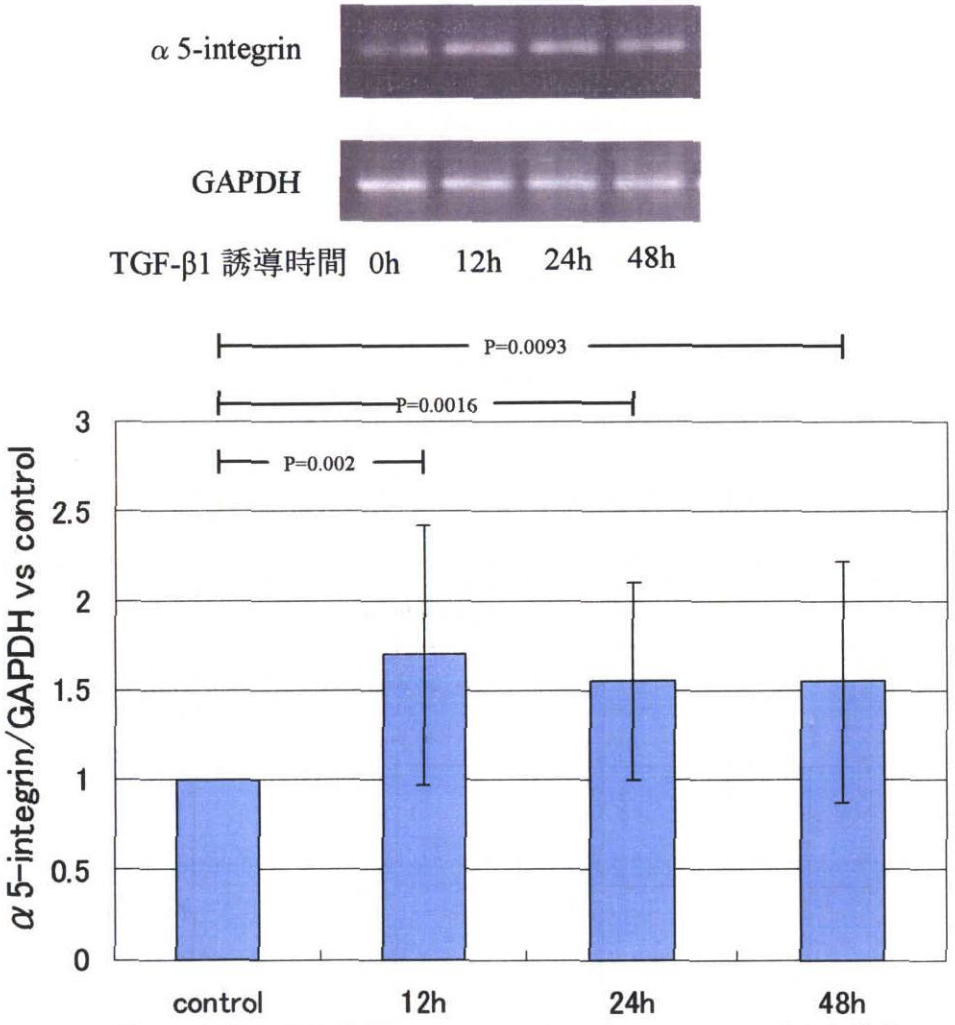
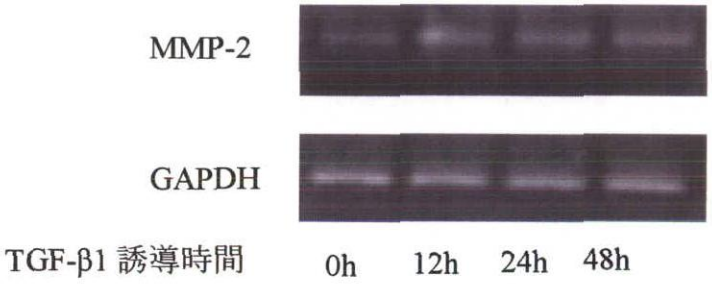


Fig.4-5 TGF-β1 誘導による α5-integrin mRNA の経時変化

4-3-4. TGF-β1 誘導による MMP-2 mRNA の経時的測定

Fig.4-6 に TGF-β1（10ng/ml）誘導に対する MMP-2 mRNA 発現の時間変化を示す。TGF-β1 誘導に対して MMP-2 mRNA は 12h の時点から強い発現を示し、48h でもその強い発現を維持していた（n=6）。



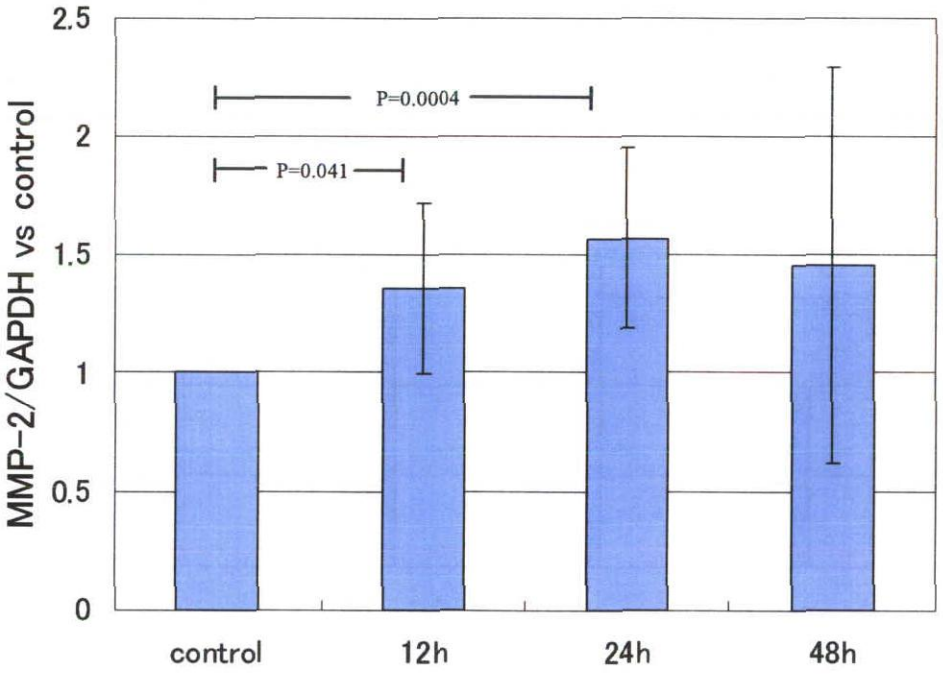


Fig.4-6 TGF-β1 誘導による MMP-2 mRNA の経時変化

4-4. 化学走化性因子を用いた EMT 細胞の三次元細胞遊走評価

4-4-1. FN を用いた遊走細胞数の計測

Fig.4-7 に三次元遊走モデルを用い、化学走化性因子として下層へ FN の濃度勾配を形成し、膜下及びコラーゲンゲル中へ遊走した細胞を測定し、FN なしのときの遊走細胞数を 1 として結果を示す。FN を含んでいない状態に比べて、FN 濃度勾配が存在すると下層へ遊走した細胞数は増加した。下層に遊走した細胞数は FN の拡散 48h で Control の 1.6 倍になり、72h で 2.1 倍もの細胞が遊走した。(n=5)。

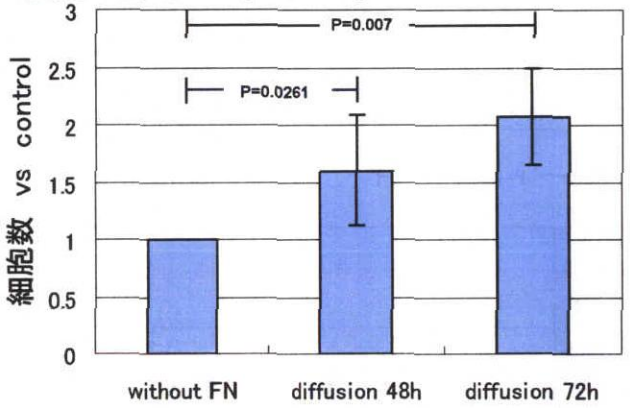


Fig.4-7 下層へ遊走した細胞数 vs control

4-4-2. BSA を用いた遊走細胞数の計測

Fig.4-8 に三次元遊走モデルを用い、化学走化性因子として下層へ BSA の濃度勾配を形成し、膜裏及びコラーゲンゲル中へ遊走した細胞を測定、BSA なしのときの細胞数を 1 としたグラフを示す。BSA を含んでいない状態に比べて、BSA 濃度勾配が存在すると下層へ遊走した細胞数は 16h で 1.2 倍に、24h で 1.4 倍の細胞数へとわずかに増加したが、有意差は見られなかった (n=5)。

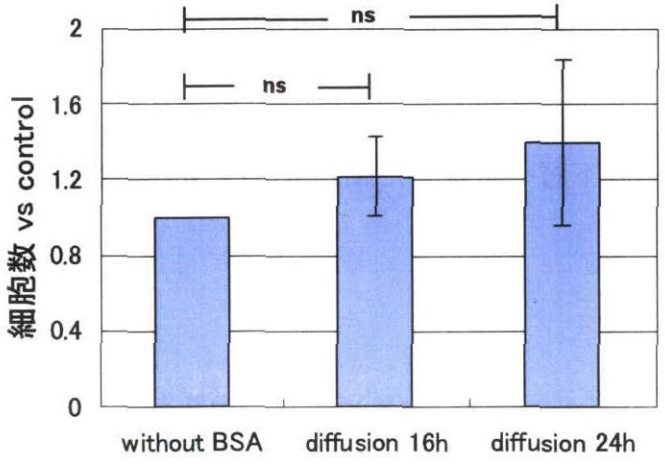


Fig.4-8 下層へ遊走した細胞数 vs control

4-4-3. FN を用い、RGDS により阻害した際の遊走細胞数の計測

Fig.4-9 に三次元遊走モデルを用い、EMT 誘導しなかったもの及び誘導し、integrin の阻害剤 RGDS を添加したときの結果を示す。これは化学走化性因子として下層へ FN の濃度勾配を形成し、膜下及びコラーゲンゲル中へ遊走した細胞を測定した結果で、EMT 誘導あり FN なしのときの遊走細胞数を 1 としたもののグラフである。EMT 誘導していないものは、EMT 誘導したものと比べ遊走していないことが分かる。また RGDS による阻害は、EMT 誘導細胞の遊走をかなり抑えることが分かった(n=3)。

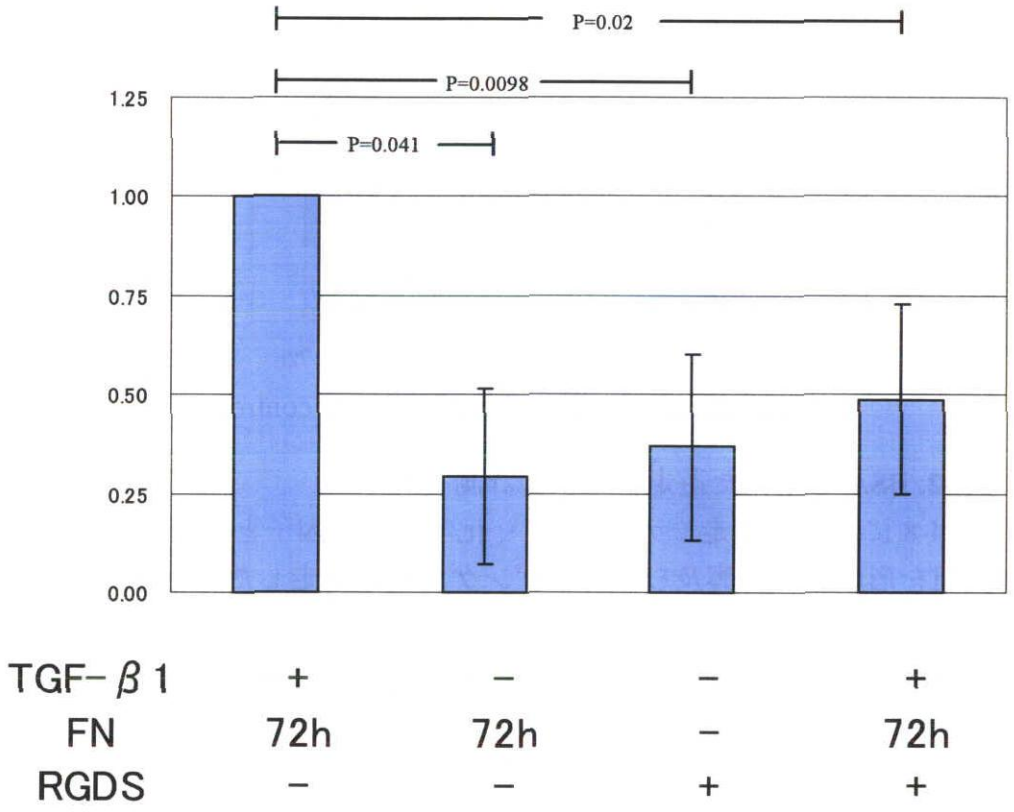


Fig.4-9 下層へ遊走した細胞数 vs EMT 誘導 HPMC

4-4-4. 細胞増殖試験

Fig.4-10 に各条件下において細胞増殖への影響を測定した結果を示す。条件は以下の 4 種類で行った（n=3）。

- 10%FBS/M199
- 0.1%FBS/M199
- 0.1%FBS/M199 + 10ng/ml TGF-β1
- 0.1%FBS/M199 + 10ng/ml TGF-β1 + 10μg/ml FN

通常の細胞培養条件下である 10%FBS/M199 では細胞は増殖し続けた。一方 growth arrest や EMT を起こさせる条件化では細胞は増殖しなかった。

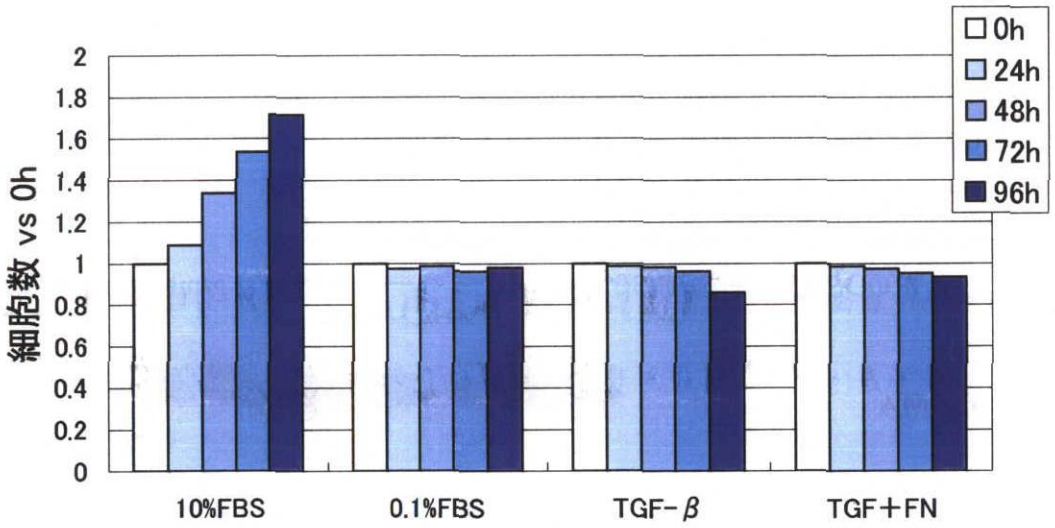


Fig.4-10 細胞増殖の割合

4-4. TGF-β1 誘導による α-SMA の経時的測定

Fig.4-11 に FN が α5-integrin に接着した際の α-SMA 発現の時間変化を、ウェスタンブロット法により測定した結果を示す。実験条件は 4 種類作り、以下に記す。値は α-SMA の発現量において control が 1 となるように補正を行った。control 以外では非常に顕著な発現が見られた（n=3)。とくに TGF-β1 曝露後、FN を添加したものは α-SMA の発現が大きく見えた。このことは RGDS で阻害を行うことで TGF-β1 曝露と同じ程度の発現になることからも伺える。

実験条件

①0.1%FBS/M199

②0.1%FBS/M199 + 10ng/ml TGF-β1(24h 曝露)

③0.1%FBS/M199 + 10ng/ml TGF-β1 (24h 曝露)

⇒ 10μg/ml FN (24h 曝露)

④0.1%FBS/M199 + 10ng/ml TGF-β1 (24h 曝露)

⇒ RGDS 阻害剤添加(30 分インキュベート) ⇒10μg/ml FN (24h 曝露)

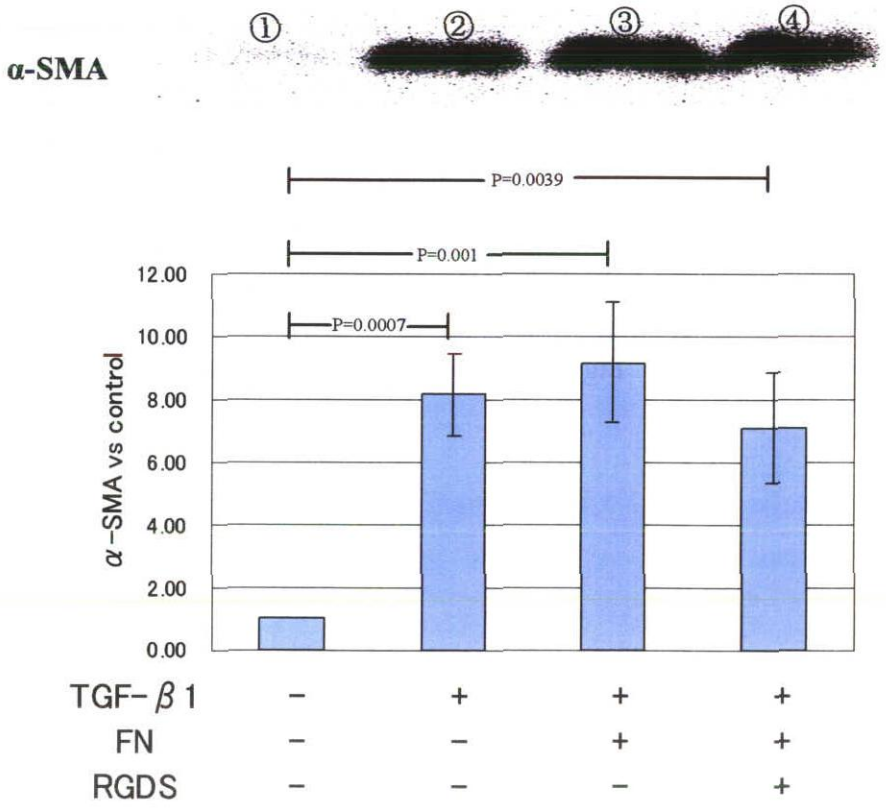


Fig.4-11 三次元遊走実験条件下での α-SMA control

5. 考察

5-1. 腹膜透析における TGF-β1 の産生機序

高濃度 glucose やグルコース分解産物（GDP）によって HPMC では、PKC（protein kinase C）の活性化が起こる[35]。活性化 PKC により脱リン酸化した転写因子 c-Fos と c-Jun の複合体（AP-1 : activated protein-1）は、TGF-β1 遺伝子上のプロモーター領域の AP-1 結合部位に結合し、TGF-β1 mRNA が発現する。それにより TGF-β1 の産生が促進される（Fig.5-1）[16]。このような経路によって、HPMC では TGF-β1 がオートクリンに産生され、TGF-β1 が HPMC に作用する事で EMT が進行すると考えられる[8]。

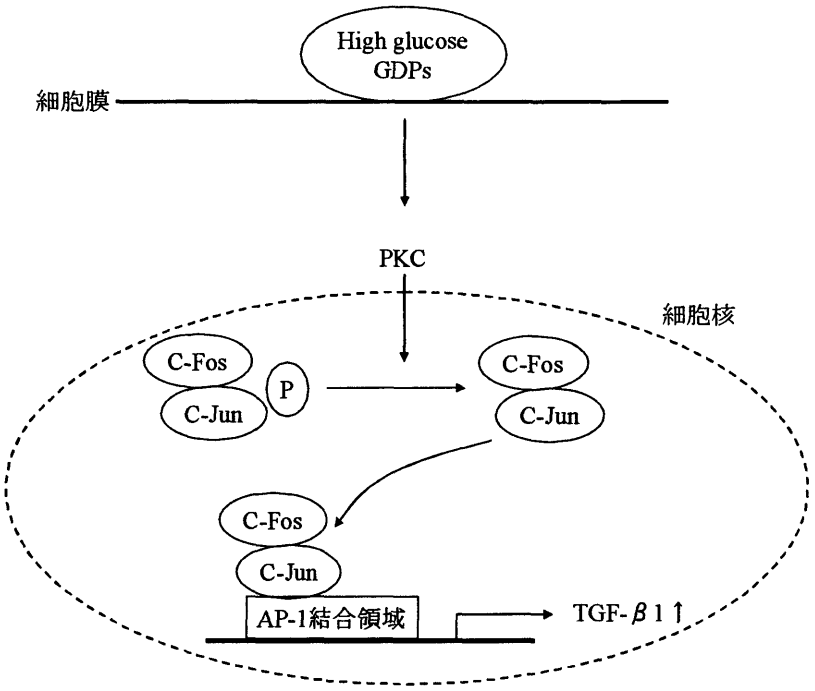


Fig.5-1 TGF-β1 の産生経路

5-2. TGF-β1 による Snail mRNA 発現に伴う E-cadherin mRNA の減少メカニズムとその役割

本研究において TGF-β1 を HPMC に作用させたとき、Snail mRNA は TGF-β1 誘導 12 時間後に有意な発現の増加を示したのに対して(Fig.4-3)、E-cadherin mRNA は 12 時間では有意な減少は見られず、24h で有意な減少を示した(Fig.4-4)。このような mRNA は以下のシグナル伝達経路を経由することが考えられている。

TGF-β 1 が HPMC 細胞の膜上に存在する TGF-β1 レセプター（セリン/スレオニンキナーゼレセプター）に結合すると、レセプターの細胞内ドメインにあるセリン/スレオニン残基がリン酸化する。続いて TGF-β1 が結合したレセプターがエンドサイトーシスし、SH2/SH3 ドメインを有する PI3K（ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ）がリン酸化部位に結合する。PI3K は細胞膜上の PIP2（ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸）を PIP3（ホスファチジル 3,4,5-トリスリン酸）へとリン酸化する。続いて SARA（Smad Anchor for Receptor Activation）は PIP3 及び TGF レセプターと結合する。Smad2/3 は SARA を介して TGF レセプターと結合しリン酸化される[36,37]。リン酸化した Smad2/3 は Co-Smad である Smad4 と複合体を作ることで核内へと移行し、Snail mRNA のプロモーター領域に作用する事で Snail mRNA を発現させる[11,36]。またもう一つの経路として MAPK カスケードがある。それは Ras、Raf、MEK、ERK という経路のリン酸化を通して活性化し、Snail mRNA を発現させる[36]。これらの経路によって発現した Snail mRNA は E-cadherin mRNA のプロモーター領域に作用する事で、E-cadherin mRNA の発現を抑制する。

adherence junction を構成する E-cadherin は細胞間接着を維持する事で、細胞の形態を維持している。しかし TGF-β1 などによって E-cadherin が減少すると、細胞間接着が失われることで形態変化を起こし、間葉系細胞のように遊走能を持つものと思われる。また細胞間接着の指標（EMT の指標）としては tight junction の構成成分である ZO-1 や Occludins なども用いられている[3,14]。ZO-1 や Occludins は glucose 添加によってリン酸化され、down-regulate し、溶質透過性の亢進に関与する主要なタンパク質である[38]。adherence junction や tight junction はそれぞれが細胞内で細胞骨格タンパク質アクチンと結合していることから、EMT と溶質透過性亢進の間には関連性があると思われる。

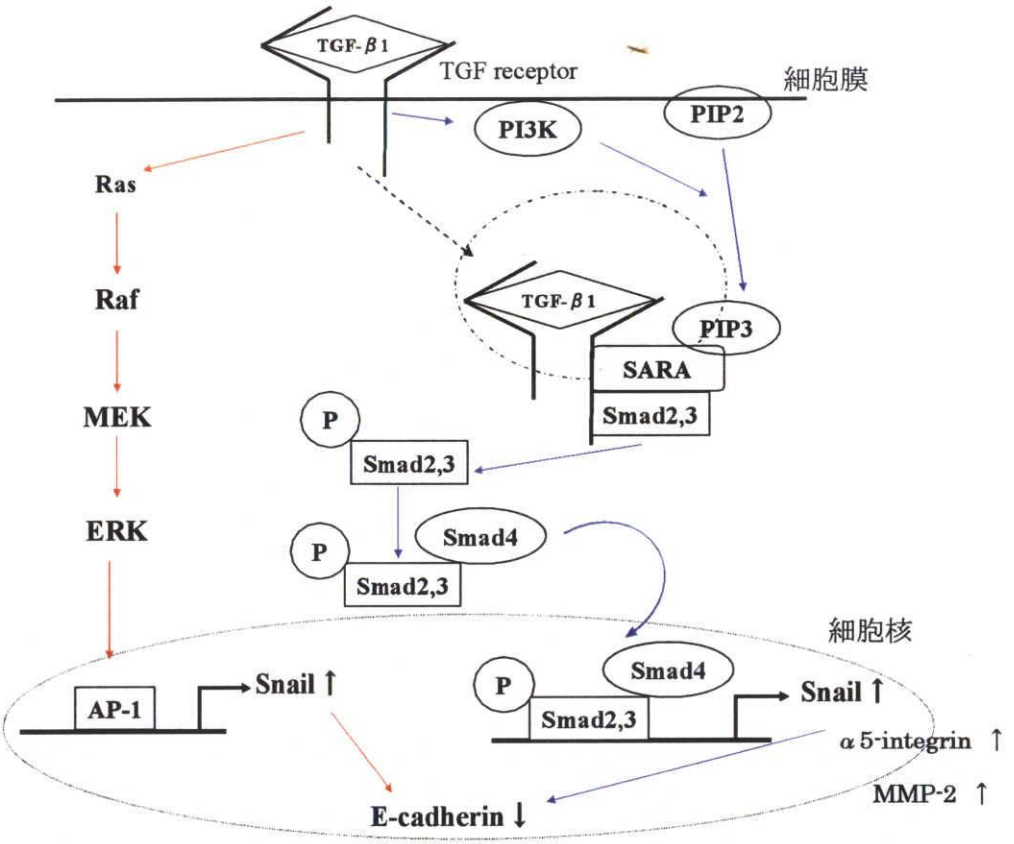


Fig.5-2 TGF-β1 による Snail mRNA 発現メカニズム

これらのシグナル伝達メカニズムから、Snail mRNA 発現に遅れて E-cadherin mRNA 発現の減少が起こると考えられる。

5-3. EMT 誘導 HPMC における α5-integrin、MMP-2 mRNA および α-SMA の発現と遊走における役割

細胞の遊走に大きな役割を果たしていると考えられている因子すなわち、α5-integrin、MMP-2、α-SMA に着目し TGF-β1 による HPMC からの発現を調べた。これらの因子について簡単に記す(Table.5-1)

Table.5-1 細胞遊走因子とその役割

	間質層への遊走における役割
α5-integrin	FN と結合することで様々な遊走に関するシグナルを細胞に伝達する
MMP-2	間質層中の Collagen を分解する
α-SMA	細胞遊走に必要なストレスファイバー

このような役割を持った因子は、TGF-β1 誘導によってα5-integrin mRNA の強発現(Fig.4-5)、MMP-2 mRNA の強発現(Fig.4-6)が見られ、さらにはα-SMA の強発現が見られた(Fig.4-11)。また 3 次元遊走実験において、EMT 誘導 HPMC と誘導なしの HPMC の遊走細胞数を比較すると、EMT 誘導なしに比べ、EMT 誘導のほうが遊走細胞数が多かった。この遊走細胞数の増加は、TGF-β1 誘導により増加した MMP-2 が下層の collagen を分解し、α-SMA の発現により遊走能が高まったためだと考えられる。

この MMP-2 やα5-integrin の TGF-β1 誘導による発現は Snail mRNA と同じシグナル伝達経路で発現すると考えられている(Fig.5-2)。一方α-SMA の発現は、まず TGF-β1 が細胞膜上に存在する TGF-β1 レセプターと作用する事で、低分子量 G タンパク質の Rho ファミリーである RhoA を活性化することで始まる。この活性化した RhoA は mDia（mammalian diaphanous）、DIP（diaphanous-interacting protein)、Arp2/3 複合体を経由または mDia、プロフィリンを経由してα-SMA 発現を増加させる。一方で RhoA は Rho キナーゼである ROCK（Rho associated coiled-coil-containing protein kinase）と結合し、活性化 ROCK は MLC（myosin light chain）をリン酸化してα-SMA の会合を促進する（Fig.5-3)。これらは RhoA や ROCK の阻害実験により実証されている[14,39]。

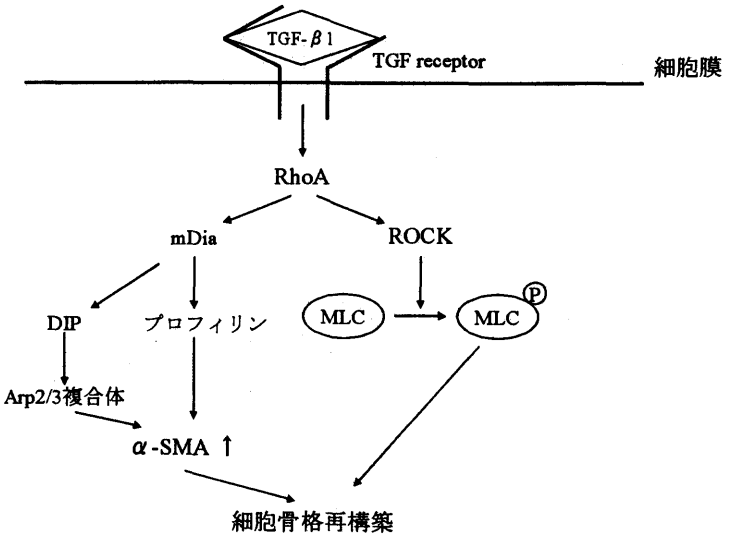


Fig.5-3 TGF-β1 誘導による α-SMA 再構築のシグナル伝達経路

このように TGF-β1 誘導を起こした HPMC は、MMP-2 や α-SMA を発現することで遊走能が増加すると考えられる。

さらに α-SMA の発現に注目すると、TGF-β1 誘導 HPMC に FN を添加したとき、TGF-β1 誘導のみのものに比べ、発現の増加が見られた(Fig.4-11)。このことから TGF-β1 誘導 HPMC に FN が作用するときさらに遊走細胞数が増加することが考えられる。実際三次元遊走実験において、下層の collagen ゲル中に FN の濃度勾配を形成したときに遊走する細胞数が、下層に FN を含まないものに比べ増加した(Fig.4-7)。一方下層に BSA の濃度勾配を形成したときは、EMT 誘導 HPMC の遊走細胞数は、下層に何も仕込まなかったもの(control)と有意差は見られなかった(Fig.4-8)。さらに FN の接着を阻害する合成ペプチド RGDS を添加すると、下層に FN の濃度勾配を形成させ EMT(+)HPMC の遊走細胞数は、EMT(-)HPMC と同程度に遊走細胞数が減少した(Fig.4-9)。このように FN の添加により遊走細胞数が増加する原因は、TGF-β1 誘導によって強発現した α5-integrin が FN に結合したためと考えられる(Fig.4-6)。

以下 TGF-β1 誘導 α5-integrin の発現と FN との結合について考察すると、前記したように Snail の発現と同じシグナル伝達経路によって発現すると考えられている(Fig.5-2)。図 5-4 に示すように発現した α5-integrin は FN と結合することで、FAK(Focal adhesion kinase)をまずリン酸化する。FAK のリン酸化に伴い Src(非受容型チロシンキナーゼ)の活性化が引き起こされ、同時に Paxillin(接着斑構成タンパク質)においても活性化がおこる。これら 2 つの経路の内、まず Src を経由するシグナル伝達経路では、ERK(Extracellular

signal-Regulated Kinase)を通り、接着斑のターンオーバーを行う経路と p-130 Cas (Crk associated substrate)や Rac(Small GTPase)、JNK (Jun amino-terminal kinase)を経由し、MMP-2(コラーゲン分解酵素)を産生し、間質層への遊走を促進する経路にシグナルが平行して伝わる。また Paxillin を経由する経路も平行して活性化し、Rac を経由し接着斑のターンオーバーや葉状仮足の形成、またさらに Arp2/3 (Actin-related protein)を経由しα-SMA の形成に働く[58]。

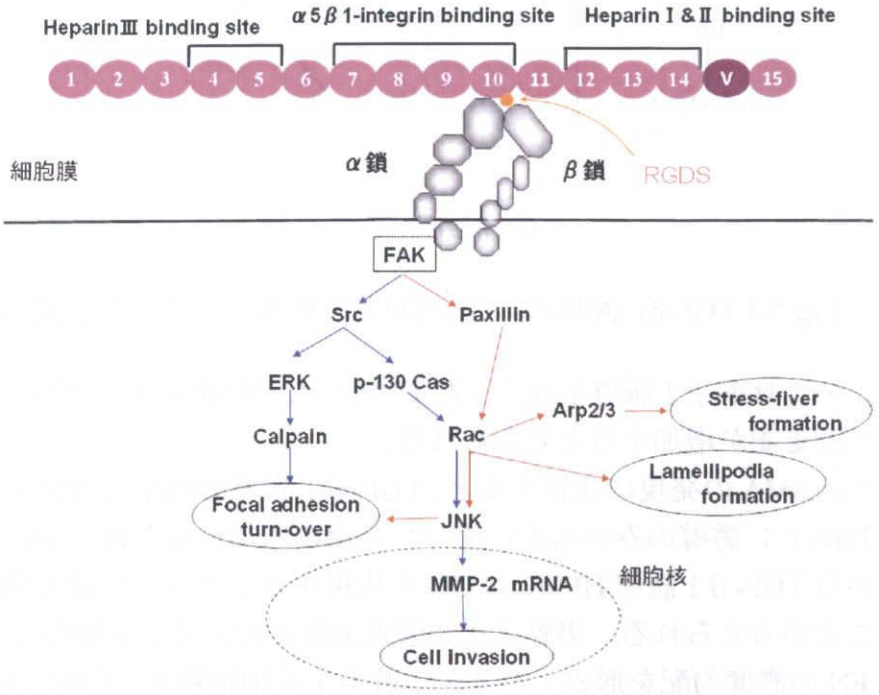


Fig.5-4 integrin-FN 接着による α-SMA 再構築のシグナル伝達経路

このように、TGF-β1 により強発現したα5-integrin は FN と結合し、Talin といった接着斑のターンオーバーや MMP-2 mRNA を発現することによる細胞の間質層への遊走(cell invasion)の促進や、葉状仮足の形成、α-SMA(Stress-fiber)の形成などを引き起こすことから、α5-integrin が FN と結合し遊走することが示された。長期腹膜透析において間質層中に観察されたサイトケラチン(+)の線維芽様細胞の源が腹膜中皮細胞であることを裏付ける重要な証明となった。

5-4. FN 阻害剤としての RGDS の妥当性

EMT 誘導 HPMC と FN の結合が細胞遊走の実態であることを、さらに明確にするため、両者の結合阻害剤 RGDS[59](Arginine-Glycine-Aspartic acid-Serine)を用いて検討した。アミノ酸配列 RGDS は、緒言に記したように FN に含まれる integrin 接着部位である(Fig.1-11)。これを FN 添加前に 30 分インキュベートすることで、FN-integrin の結合の阻害という実験を行った。三次元遊走実験において、RGDS による阻害を行った EMT 誘導 HPMC は、下層に FN が存在する条件においても、ゲル中や膜下に遊走する細胞数が、RGDS による阻害を行っていないものに比べると遊走細胞数が顕著な減少が見られたことから RGDS による阻害が十分に行われていることを示している(Fig.4-9)。また三次元遊走条件下でのウェスタンブロットにおいて、RGDS による阻害によって、α-SMA の発現が一部減少したことからも RGDS による阻害ができると考えられる(Fig.4-11)。

しかし RGDS を EMT 誘導 HPMC に作用させるだけでは、integrin が接着したことと変わらないのではないかという疑問が生ずるが、これは FN と integrin の結合機構とシグナル伝達を詳しく考察することで解決できる。まず integrin が FN の RGD ループ(RGDS)に強く結合し、FN とのアンカーの役割を果たす。その後、integrin に近接している Syndecan(HSPG : Heparan sulphate proteoglycan 及び CSPG : Condroitin surface proteoglycans)[53][54]がヘパリン結合部位(Fig.1-9 及び Fig.1-12)に作用することで、integrin 下に接着している FAK を活性化、その後 Fig.5-4 の経路や RhoA (Ras homolog gene family, member A)を経由することでα-SMA を形成するようになる(Fig.5-5)

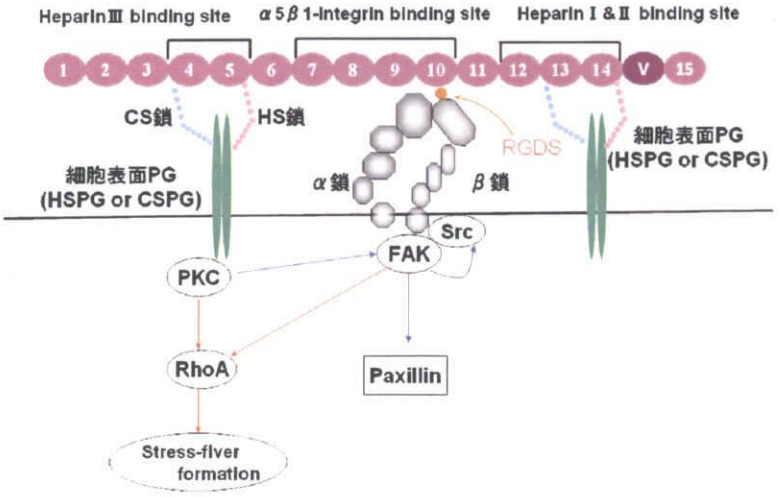


Fig.5-5 Syndecan と integrin の相互作用によるシグナル経路図

このシグナル伝達経路図にあるように、FN が細胞に作用するとき、Syndecan と integrin が非常に近い位置にあり、同時に作用しあわなければ活性化しない。本実験のように、RGDS によりあらかじめ細胞の integrin の接着を行ってしまうと、Syndecan が FN の Heparin 結合部位に接着することができなくなり、それによりシグナル伝達ができなくなることから、RGDS による阻害ができると考えられる。

5-5. 総括

本研究ではコラーゲンゲルを積層させることによって化学走化性因子の濃度勾配を任意に形成し、下層へ遊走した細胞を定量的に測定するという新規三次元遊走モデルを作成した。このモデルは今までの遊走モデルにはなかった炎症時に形成されるであろう間質中の走化性因子の濃度勾配を考慮したもので、より生体に近い遊走モデルである。

このモデルを使うことで、EMT 誘導 HPMC の間質層への遊走に FN が関与している可能性が示された。これにより、腹膜透析における腹膜線維症や腹膜劣化抑制など、腹膜透析の更なる長期継続を可能にできるような材料開発を可能とする。さらにはこの遊走モデルは腹膜組織の EMT 誘導 HPMC の遊走メカニズムの解明だけでなく、ガン細胞の浸潤メカニズムや器官形成時の細胞遊走メカニズムの解明などさまざまな分野への応用が考えられる。

6. 結論

目的より以下のことが結論として導き出せた。

①TGF-β1曝露によるHPMCの形態変化の観察及びmRNA測定からのEMT誘導の確認

10ng/ml TGF-β1で誘導されるHPMCは

・敷石状の形態から扁平で細長い形態に変化した。

・転写因子 Snail mRNA発現が増加し、誘導後24hで最大の発現を示した。

・細胞間接着タンパク質E-cadherin mRNAが時間依存的に減少した。

形態変化を伴うEMT発生の主な3種類の指標を確認することができたので、本モデルを EMT 発生モデルとして三次元細胞遊走実験に使用した。

またこの条件のときその他のmRNAは

・FNレセプターα5-integrin mRNAはTGF-β1誘導12時間後から発現を増し、48時間後でも維持していた。

・またコラーゲン分解酵素MMP-2 mRNAはα5-integrinと同じように12時間後から発現が見られ、48時間後においても発現が維持されていた。

このことから、EMTを起こしたHPMCはα5-integrinを強発現しており、FNをリガンドとして結合する事が可能であることが明らかとなった。またコラーゲン分解酵素である MMP-2 が間質層中のコラーゲンを分解することが可能であることが確認できた。

②EMT誘導中皮細胞が化学層化性因子の濃度勾配を認識して遊走することをin vitro実験系で実証

・三次元遊走モデルを用い、化学走化性因子としてBSAを用いると、下層へ遊走した細胞数はcontrolと比較して1.2倍ほどであった。

・一方、化学走化性因子としてFNを用いると、下層へ遊走した細胞数はcontrolと比較して2.1倍ほど増加した。

・細胞増殖試験から本実験で使用した EMT 発生モデル及び三次元遊走モデルで細胞数は変化することは無かった。

EMTを起こしたHPMCは、周囲に存在する化学走化性因子を認識して遊走していることが明らかとなった。

③EMT 誘導 HPMC の腹膜間質層への遊走の原因を証明

・TGF-β1 誘導により HPMC はα5-integrin mRNA と MMP-2 mRNA の強発現を起こしている

・BSA の濃度勾配に対して遊走細胞数の有意差は見られなかったものの、FN の濃度勾配においては大きな有意差が見られた。

・また FN の濃度勾配作成三次元遊走モデルにおいて、FN 阻害剤である RGDS により大きな阻害が見られた。

EMT 誘導 HPMC の腹膜間質層への遊走の原因として FN が関与していることが考えられる

④従来の三次元遊走評価法をより改良した新しい三次元細胞遊走装置を試作

今回作成した新規三次元細胞遊走装置は、化学層化性因子の濃度勾配を考慮したものである。本実験の結果から、EMT 誘導 HPMC は化学層化性因子特に FN を認識し、その FN の濃度勾配に従って遊走細胞数が増加するというものになった。

このことから今回作成した新規三次元細胞遊走装置は、より生体に近い条件を作り出すとともに、以前までのものと比べると、細胞遊走メカニズムの解明をより可能にするものと証明できた。

最後に腹膜透析時における HPMC の EMT 発生についてまとめると、HPMC は TGF-β1 により Snail mRNA を発現し、それによって E-cadherin が減少した。さらにα-SMA を発現することにより形態が扁平状に細長く変化した。α5-integrin を強発現し、間質中に存在する FN を認識する事で、濃度勾配に沿って濃度の高い方へと遊走した。これにより EMT を起こした HPMC は間質中に存在する化学走化性因子を認識して間質へ遊走し、間質線維症を引き起こす原因の一つとなることが示唆された。

7. 今後の展望

・細胞遊走に関与が考えられるシグナル伝達物質の変化の測定

細胞遊走に関与が考えられているシグナル伝達物質、FAK や ERK が今回行った三次元遊走実験条件下で活性化が起きるかどうかウェスタンブロットで測定する。

・阻害剤を利用したシグナル経路の解明

前記に書いた FAK や ERK などを活性化することで細胞の遊走能が増加することは知られているものの、どのような経路を通ってシグナルが伝達するかについてはまだ十分にわかっていない。そこでさまざまなシグナル阻害を行い、シグナル経路を同定する。

・様々な化学走化性因子（IL-8 など）を用いて三次元遊走実験

様々な化学走化性因子を用いる事で、EMT を起こした HPMC に対してより強く機能する化学走化性因子を検証する。

8. 参考文献

1 坂井 建雄, 河原 克雅 著. カラー図解 人体の正常構造と機能 □腎・泌尿器. 日本医事新報社 1999

2 Gary A.T, et al. カラーで学ぶ解剖生理学. 医学図書院 MYW, 1998

3 飯田 喜俊, 二瓶 宏, 秋澤 忠男, 椿原 美治 編. ©EBM 血液浄化療法. 株式会社 金芳堂 2000

4 平原 一郎, 他. 中皮細胞の epithelial-to-mesenchymal transition(EMT)による腹膜肥厚の促進. 腹膜透析 2007 東京医学社

5 Gotloib L, et al. Functional structure of the peritoneum as a dialyzing membrane, In: R. Gokal, et al (eds) Textbook of Peritoneal Dialysis Second Edition. Dordrecht: Kluwer 2000; 37-106

6 Selgas R, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition of the mesothelial cell-its role in the response of the peritoneum to dialysis. Nephrol Dial Transplant 2006; 21: ii2-ii7

7 Jimenez-Hefferman J.A, et al. Immunohistochemical characterization of fibroblast subpopulations in normal peritoneal tissue and in peritoneal dialysis-induced fibrosis. Virchows Arch 2004; 444: 247-256

8 Yanez-Mo M, et al. Peritoneal Dialysis and Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Mesothelial Cells. N Engl J Med 2003; 348: 403-413

9 Bucala R, et al. Circulating fibrocytes difine a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. Mol Med 1994; 1: 71-81

10 Luiz S. Aroeira, et al. Epithelial to Mesenchymal Transition and Peritoneal Membrane Failure in Peritoneal Dialysis Patients: Pathologic Significance and Potential Therapeutic Interventions. J Am Soc Nephrol 2007; 18:2004-2013

11 LaGamba D, et al. Microarray Analysis of Gene Expression During Epithelial-Mesenchymal transformation. Dev Dyn 2005; 234: 132-142

12 Dokic D, et al. VCAM-1 inhibits TGFbeta stimulated epithelial-mesenchymal transformation by modulating Rho activity and stabilizing intercellular adhesion in epicardial mesothelial cells. Dev Biol 2006; 299: 489-504

13 Zeisberg M, et al. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. Nat Med 2003; 9: 964-968

14 Maszi A, et al. Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. Am J Physiol Renal

Physiol 2003; 284: F911-F924
15 Tian Y.C, et al. Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 enhance HK-2 cell migration through a synergistic increase of matrix metalloproteinase and sustained activation of ERK signaling pathway. Exp Cell Res 2007; 313: 2367-2377
16 Ha H, et al. High glucose-induced PKC activation mediates TGF-beta 1 and fibronectin synthesis by peritoneal mesothelial cells. Kidney Int 2001; 59: 463-470
17 Offner F.A, et al. Transforming growth factor-beta synthesis by human peritoneal mesothelial cells. Induction by interleukin-1. Am J Pathol, 1996; 148: 1679-1688
18 Okada H, et al. Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation. Am J Physio 1997; 273: F563-F574
19 White L.R, et al. The characterization of alpha5-integrin expression on tubular epithelium during renal injury. Am J Physiol Renal Physiol 2007; 292: F567-F576
20 Strutz F, et al. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. Kidney Int 2002; 61: 1714-1728
21 Fan J.M, et al. Interleukin-1 induces tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation through a transforming growth factor-beta1-dependent mechanism in vitro. Am J Kidney Dis 2001; 37: 820-831
22 Oldfield M.D, et al. Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). J Clin Invest 2001; 108: 1853-1863
23 Yang L, et al. P68 RNA helicase mediates PDGF-induced epithelial mesenchymal transition by displacing Axin from beta-catenin. Cell 2006; 127: 139-155
24 Liu Y, et al. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. J Am Soc Nephrol 2004; 15: 1-12
25 竹縄 忠臣, 他. 実験医学 3 細胞極性と細胞運動. 羊土社 2001
26 Greiling D, et al. Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. J Cell Sci 1997; 110: 861-870
27 Bates R.C, et al. Transcriptional activation of integrin beta6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. J Clin Invest 2005; 115: 339-347

28 Strizzi L, et al. Epithelial mesenchymal transition is a characteristic of hyperplasias and tumors in mammary gland from MMTV-Cripto-1 transgenic mice. J Cell Physiol 2004; 201: 266-276
29 Grinnell F, et al. Nested collagen matrices: a new model to study migration of human fibroblast populations in three dimensions. Exp Cell Res 2006; 312: 86-94
30 Schnyder B, et al. Role of interleukin-8 phosphorylated kinases in stimulating neutrophil migration through fibrin gels. Lab Invest 1999; 79: 1403-1413
31 Takahashi M, et al. Effects of endogenous endothelial interleukin-8 on neutrophil migration across an endothelial monolayer. Cardiovasc Res 1995; 29: 670-675
32 Zhuang S, et al. Requirement of the epidermal growth factor receptor in renal epithelial cell proliferation and migration. Am J Physiol Renal Physiol 2004; 287: F365-F372
33 Becker P.M, et al. Differential regulation of diverse physiological responses to VEGF in pulmonary endothelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001; 281: L1500-L1511
34 金森 誠司 著. ヒト服膜中皮細胞の傷害修復過程におけるヒアルロン酸合成酵素 HAS2 mRNA 発現とヒアルロン酸産生の研究. 平成 17 年度三重大学大学院工学研究科博士前期過程分子素材工学専攻修士論文 2006
35 Leung J.C, et al. Glucose degradation products downregulate ZO-1 expression in human peritoneal mesothelial cells: the role of VEGF. Nephrol Dial Transplant 2005; 20: 1336-1349
36 Medici D, et al. Cooperation between snail and LEF-1 transcription factors is essential for TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. Mol Biol Cell 2006; 17: 1871-1879
37 Itoh F, et al. The FYVE domain in Smad anchor for receptor activation (SARA) is sufficient for localization of SARA in early endosomes and regulates TGF-beta/Smad signaling. Genes Cells 2002; 7: 321-331
38 坂野 真利 著. 活性酸素種による細胞間結合タンパクの非局在化に関する研究. 平成 18 年度三重大学大学院工学研究科博士前期過程分子素材工学専攻修士論文 2007
39 竹縄 忠臣 編. 細胞骨格と細胞運動 その制御メカニズム. シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社 2002
40 Yang J, et al. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. Am J Pathol 2001; 159: 1465-1475
41 Yang L, et al. Gene targeting of Cdc42 and Cdc42GAP affirms the critical

involvement of Cdc42 in filopodia induction, directed migration, and proliferation in primary mouse embryonic fibroblasts. Mol Biol Cell 2006; 17: 4675-4685

42 Garcia-Vicuna R, et al. CC and CXC chemokine receptors mediate migration, proliferation, and matrix metalloproteinase production by fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. Arthritis Rheum 2004; 50: 3866-3877

43 Zhao Z, et al. Rho-associated kinases play a role in endocardial cell differentiation and migration. Dev Biol 2004; 275: 183-191

44 Kalluri R, et al. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. J Clin Invest 2003; 112: 1776-1784

45 Flessner M.F; et al. The transport barrier in intraperitoneal therapy. Am J Physiol Renal Physiol 2005; 288: F433-F442

46 Ogata S, et al. Glucose and prednisolone alter basic fibroblast growth factor expression in peritoneal mesothelial cells and fibroblasts. J Am Soc Nephrol 2001; 12: 2787-2796

47 Chen S, et al. High glucose-induced, endothelin-dependent fibronectin synthesis is mediated via NF-kappa B and AP-1. Am J Physiol Cell Physiol 2003; 284: C263-C272

48 Isaji T, et al. N-glycosylation of the beta-propeller domain of the integrin alpha5 subunit is essential for alpha5beta1 heterodimerization, expression on the cell surface, and its biological function. J Biol Chem 2006; 281: 33258-33267

49 Inagi R, et al. Glucose degradation product methylglyoxal enhances the production of vascular endothelial growth factor in peritoneal cells: role in the functional and morphological alterations of peritoneal membranes in peritoneal dialysis. FEBS Lett 1999; 463: 260-264

50 Ding J.X, et al. The reinforcement of invasion in epithelial ovarian cancer cells by 17 beta-Estradiol is associated with up-regulation of Snail. Gynecol Oncol 2006; 103: 623-630

51 Han S, et al. Control of COX-2 gene expression through peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human cervical cancer cells. Clin Cancer Res 2003; 9: 4627-4635

52 Gao M, et al. Structure and functional significance of mechanically unfolded fibronectin type III1 intermediates. PNAS 2003;100:14784-14789

53 Jose V, et al. A synthetic peptide from the heparin-binding domain III (repeats III4/5) of fibronectin promotes stress-fibre and focal-adhesion formation in

melanoma cells. Biochem 2003;371:565-571
54 Jose V, et al. Cooperative Role for Activated a4b1 Integrin and Chondroitin Sulfate Proteoglycans in Cell Adhesion to the Heparin III Domain of Fibronectin. BioChem 1999;274:135-142
55 David C, et al. Tuning the Mechanical Stability of Fibronectin Type III Modules through Sequence Variations Structure 2004;12:21-30
56 DeannaLee M, et al. Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. BioMed 2004 ; doi:10.1186/1477-7827-2-3
57 Hirahara I, et al. Methylglyoxal induces peritoneal thickening by mesenchymal-like mesothelial cells in rats. NDT 2008; doi: 10.1093/ndt/gfn495
58 Martin P, et al. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. Nature 2004;23:7928-7946
59 Zhenyu L, et al. Two Waves of Platelet Secretion Induced by Thromboxane A2 Receptor and a Critical Role for Phosphoinositide 3-Kinases. JBC 2003;33:30725-30731
60 Takagi J et al. Structure of integrin a5b1 in complex with fibronectin. EMBO 2003;22:4607-4615
61 Sambra D et al. Defining Fibronectin's Cell Adhesion Synergy Site by Site-directed Mutagenesis. JBC 2000;149:521-527
62 Jean-Louis B et al. The Cation-binding Domain from the a Subunit of Integrin a5b1 Is aMinimal Domain for Fibronectin Recognition JBC 1998;273:24744-24753
63 Shiokawa S. Functional Role of Arg-Gly-Asp(RGD)-Binding sites on b1 Integrin in EmBryo Implantation Using Mouse Blastocysts and Human Decidua. Biology of Reproduction 1999;60:1468-1474
64 Sharma A et al. Crystal structure of a heparin- and integrin-binding segment of human fibronectin. EMBO 1999;18:1468-1479

9. 謝辞

本研究を行うにあたって、研究及び研究生活全般において、適切かつ懇切なご指導を賜り、公私においてお世話になりました三重大学工学部分子素材工学科生体材料化学研究室の堀内 孝教授、宮本 啓一准教授、事務員の村上節子様に深く感謝いたします。

また本研究を行う上で必要な大網組織を提供していただいた患者様、そしてそこに関わる諸先生方に感謝致します。

最後に、実験において大きなサポートや、貴重な意見をもらえた M1 佐野晃史君、4 年 渡部 雄一郎君ならびに生体材料化学研究室の皆様に感謝いたします。

10. APPENDIX

A-1. 細胞培養プロトコル・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**P.50**
A-2. 細胞の 2 次元遊走距離の測定（**Image J** の使い方）・・・・・・・・**P.56**
A-3. AGPC 法プロトコル・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**P.60**
A-4. RNA 定量プロトコル・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**P.63**
A-5. RT-PCR プロトコル・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**P.65**
A-6. ウェスタンブロット法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**P.82**
A-7. 三次元細胞遊走モデルの作製 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・**P.96**
A-8. 細胞増殖試験**(Image J** の使い方**)**・・・・・・・・・・・・・・・・**P.103**
B-1. 滅菌について ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**P.105**
B-2. Primer List・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**P.107**
B-3. RT/PCR program・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**P.108**
B-4. 統計処理・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・**P.110**

A-1. 細胞培養プロトコル

A-1-1. 培地の調整

＜使用機器・器具・試薬＞

- pH メーター（D52~55/HORIBA）
- 吸引ポンプ
- 10ml シリンジ（TERUMO®）
- 50 ml のシリンジ（TERUMO®）
- 注射針（TERUMO®/NN-1838R）
- Millex-GV（MILLIPORE/Cat.No.SLGV025LS/孔径 0.22 μm）
- Strivex GS（MILLIPORE/Cat. No.SVGSB1010/孔径 0.22 μm）
- STERICUP™ フィルター（MILLIPORE / SCGVU05RE）
- 30ml チューブ（アシスト/ 543.001S）
- 0.5 ml アシストチューブ（アシスト/ 72.699 S）
- Medium 199(SIGMA/ M2154)
- Penicillin streptomycin（SIGMA/P-0781）

・ Insulin Transferin Selenate（SIGMA/ I-1844）
・ L-Glutamine（SIGMA/ G-7513）
・ Hydrocortisone（SIGMA/ H-0888）
・ 1N NaOH aq（Wako /196-05635）
・ 1N HCl aq（Wako /080-08065)
・ FBS（SIGMA / F9423）

＜各溶液の調製＞

○ Fetal bovine serum（牛胎児血清）の不活性化、分注、保存

① 凍結の状態で送られてきたFBSは37℃で溶かした。溶かし終わったら数回振り、55～56℃で、時折振り混ぜながら30分間温めた（不活性化）。

② 50 mlのシリンジで吸い取り、Strivex GSで、もしくは、Stericupフィルターユニットにてフィルター滅菌し、30 mlチューブに20 mlずつ分注した。作業はクリーンベンチ内、滅菌操作で行った。

③ 冷凍庫（－20℃）で保存した。

○ 培地の調整

・ ITS（Insulin Transferin Selenate）
ITS（液体）を1.5mlアシストチューブに500μlずつ分注し、冷蔵庫にて4℃で保存した。

・ L-G（L-Glutamine）
15 ml遠沈管に5 mlずつ分注し、冷蔵庫にて4℃で保存した。

・ P-S（Penicillin-Streptomycin Solution）
5 mlアシストチューブに5 mlずつ分注し、冷凍庫にて－20℃で保存した。

・ HC（Hydrocortisone）
HC 4 mgを2 mlの無水ethanolで溶解し、DEPC処理水2 mlを加えて濾過した。0.5 mlアシストチューブに200 μlずつ分注し、R.Tで保存した。

① L-GとP-S各5 ml、ITSとHC各50 μlを添加量とした。

② 上記のサプリメントを、10 mlシリンジを用いてMillex-GVを通してフィルター滅菌し、培地（Medium-199）に添加した。

※pHを調整する場合

③ 培地のpHをPHメーター、1N NAOH aq、1N HCL aqを用いて調整

した。また、pHは7.2に調整した。
※体内の pHは7.4である。(フィルターにかけるとpHが0.2ほど上昇するため)

A-1-2. 初代培養

＜使用機器・器具・試薬＞

- CO_2インキュベーター（池本理科工業/10-0212）
- FORCED CONVECTION OVEN（ADVANTEC/DRS620DA）
- KUBOTA 2010（株式会社久保田製作所/RD3132）
- 撹拌遠心機（LABINCO/2790001）
- ウォーターバス
- Vortex
- 滅菌済手術器具一式
- 25cm^{2}培養フラスコ（住友ベークライト/ MS-21050）
- 15ml 遠心管（住友ベークライト/ MS-56150）
- 50ml 遠心管（住友ベークライト/ MS-56500）
- 遠心管立て
- 10ml ピペット（住友ベークライト/ MS-66100）
- ピペッター
- タイマー
- Medium 199（SIGMA/M2154）
- PBS（SIGMA/D8537）
- TRYPSIN-EDTA SOLUTION（10x）（SIGMA/T4174）
- FBS（SIGMA /F9423）

＜組織・細胞の入手＞

本研究で使用したHPMCは、予め本学医学部倫理委員会にて患者組織の採取につき承認を得、かつinformed consentを得た患者より頂いた大網組織に由来する。

I　組織の切断

① オートクレーブ滅菌処理した金属トレイに、滅菌済み（新品）のPBSを組織が浸る程度の量だけ入れる。
② すぐさま組織を浸し、切断箇所の上下を滅菌糸で固く縛り、縛った箇

所の間を滅菌済みハサミにて切断する。

③ 同様の操作を繰り返し、３つ前後の親指大の切片に切り分ける。

II　基本操作

① 25 ㎠培養フラスコに 10%FBS/M-199 を 5ml 加えてプレインキュベートしておく。

② 50ml 遠心管に、5.0%トリプシン/2.0%EDTA 溶液 2ml と PBS18ml を加え、0.5%トリプシン/2.0%EDTA 溶液/PBS（以下トリプシン溶液）を作製する。

③ 用意した 50ml 遠心管にトリプシン溶液 20ml を加え、親指大の大きさにした大網組織を入れて、37℃/20 分間攪拌遠心機により攪拌しながらインキュベートする。

④ 攪拌した大網を遠心管から取り出し、次の遠心管に入れ、③の操作を行う。また、大網を取り出した遠心管は 50G（遠心半径 10cm 750rpm）5 分間遠心分離を行う。

⑤ 上澄を抜き取り cell pellet を作る。50%FBS/M-199 を 2ml 加え、Vortex をかけて、再び 50G（遠心半径 10cm 750rpm）5 分間遠心分離を行う。

⑥ 再び上澄を抜き取り、10%FBS/M-199 を 1ml 加えて 10 回のピペッティングにより細胞懸濁液を作成する。この懸濁液を①で調整した 25 ㎠培養フラスコに播種し，37℃の 5%CO_2 インキュベート内にて培養する。

⑦ ③～⑥の操作を 4 回繰り返す。

A-1-3. 継代培養

＜使用機器・器具・試薬＞

- CO_2 インキュベーター（池本理科工業/10-0212）
- KUBOTA 2010（株式会社久保田製作所/RD3132）
- ウォーターバス
- Vortex
- 吸水ポンプ（日機装/BR-21B）
- 75cm^2 培養フラスコ（住友ベークライト/MS-21250）
- 25cm^2 培養フラスコ（住友ベークライト/MS-21050）
- 6 穴プレート（住友ベークライト/MS-80060）
- φ35mm シャーレ（住友ベークライト/MS-80240）

- 15ml 遠心管（住友ベークライト/MS-56150）
- 50ml 遠心管（住友ベークライト/MS-56500）
- 遠心管立て
- 10ml ピペット（住友ベークライト/MS-66100）
- ピペッター
- パスツールピペット
- タイマー
- チップ各種
- セルスクレーパー（住友ベークライト/MS-93170）
- Counting chamber（Erma/03-202-1）
- 血球計算版
- Medium 199（SIGMA/M2154）
- PBS（SIGMA/M8537）
- TRYPSIN-EDTA SOLUTION（10x）（SIGMA/T4174）
- FBS（SIGMA/F9423）

I

細胞の洗浄

① 培養フラスコの蓋を開け、口元を加熱殺菌する。
② 滅菌済みパスツールを加熱滅菌し培養フラスコ内に挿入し、培養液を吸引する。
③ PBS 溶液 5ml/25 ㎠フラスコ又は 10ml/75 ㎠フラスコを添加し、前後左右に振り洗浄する。
④ 滅菌済みパスツールを加熱滅菌し培養フラスコ内に挿入し、洗浄液を吸引する。

II　培養細胞の剥離方法　(培地：meso の場合 M-199 、fibro の場合　F-12)

① 冷凍保存してあるトリプシン 1ml に PBS9ml を加え、10 倍希釈する。（以下トリプシン溶液）
② トリプシン溶液 5ml/25 ㎠フラスコ又は 10ml/75 ㎠フラスコを加える。
③ 顕微鏡で細胞が浮いてきたことを確認後、フラスコを軽くたたく。
④ FBS1ml/25 ㎠フラスコ又は 2ml/75 ㎠フラスコを加える。
⑤ 滅菌済みセルスクレーパーを培養フラスコ内に挿入し、細胞を剥離す

る。

⑥ 滅菌済み 10ml のピペットで培養フラスコ内の細胞懸濁液を吸引し、15ml 遠心管に入れる。

⑦ 50G（750rpm5 分間）遠心分離する。

⑧ 培養フラスコに 10%FBS／培地を入れ、37℃の 5%CO_2 インキュベート内にて放置する。（75cm^2 フラスコ→15ml　6 穴プレート→2ml／穴）

⑨ ⑥で遠心分離した上澄みをピペットで吸引する。

⑩ 10%FBS／培地を 1ml 又は 3ml を遠心管に沈殿している細胞に加え、細胞懸濁液を作成し、10 回程度ピペッティングを行う。

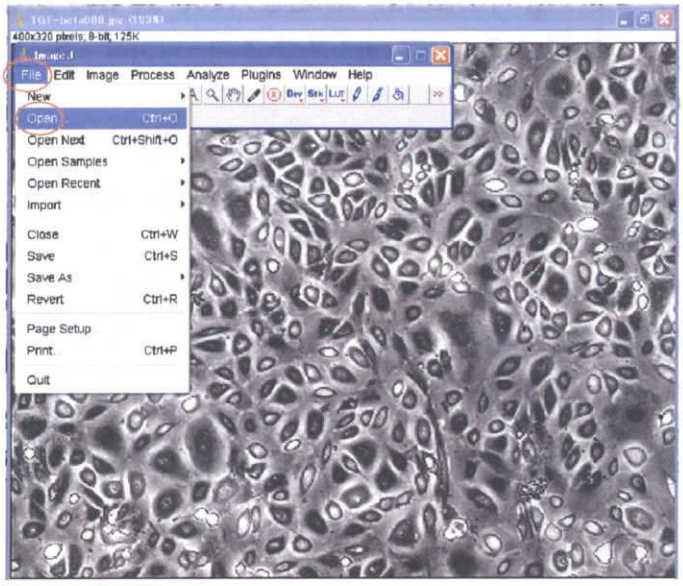
⑪ 細胞懸濁液を取り、⑦で用意しておいた培養フラスコに播種し、37℃の CO_2 インキュベート内にて培養する。（75cm^2 フラスコ→1ml　6 穴プレート→200μl／穴）

A-2. 細胞の 2 次元遊走距離の測定（Image J）

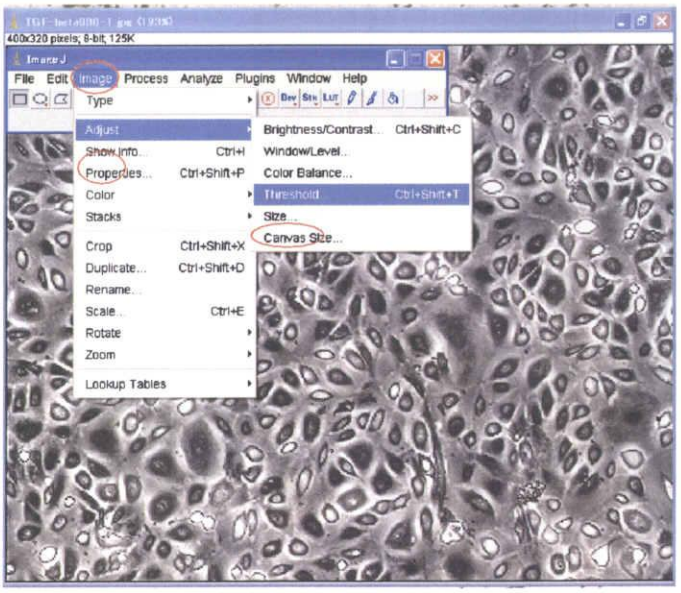
[下処理]

①「Image J」を選択し、起動させる。

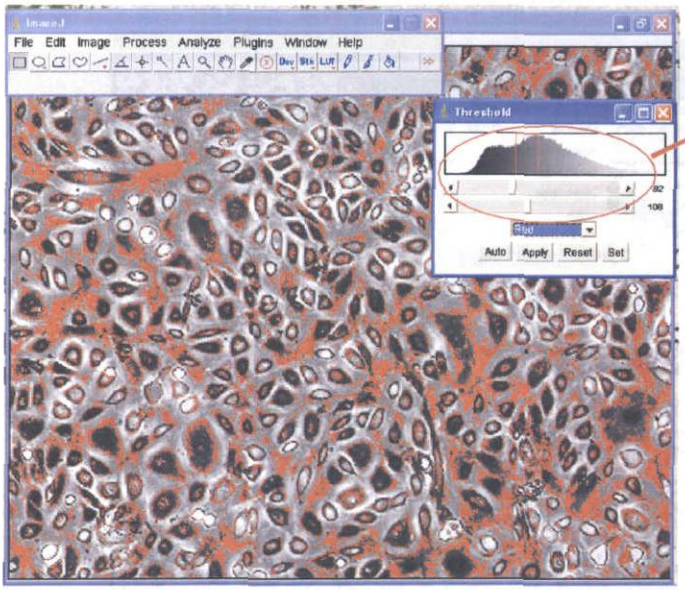
②「File」で目的の写真を選択する。



③「Image」を選択し、「Adjust」→「Threshold」を選択する。



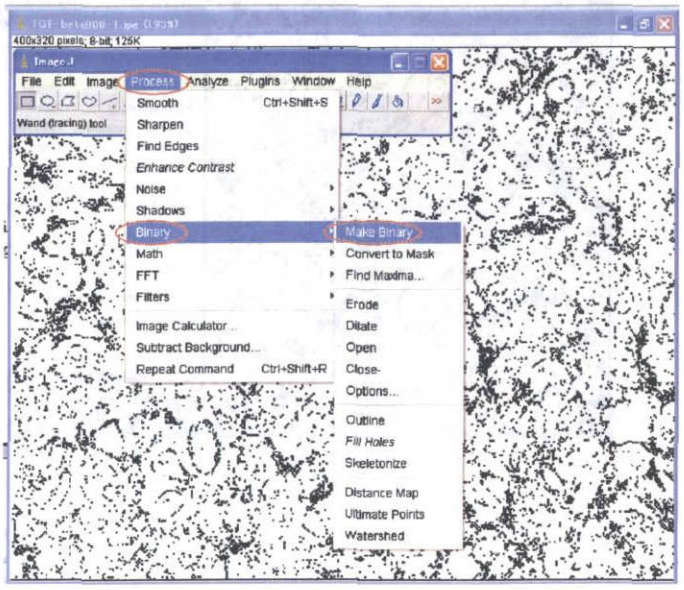
④「Threshold」でピクセル数の上限と下限を設定する



・上のツールバーの設定
→下限の設定
・下のツールバーの設定
→上限の設定

＊ 目的の細胞が赤の点で囲まれるように設定すること
＊ またなるべく細胞の数を少なくすること

⑥最後に「Process」を選択し、「Binary」→「Make Binary」を実行し、白黒の画像にする。

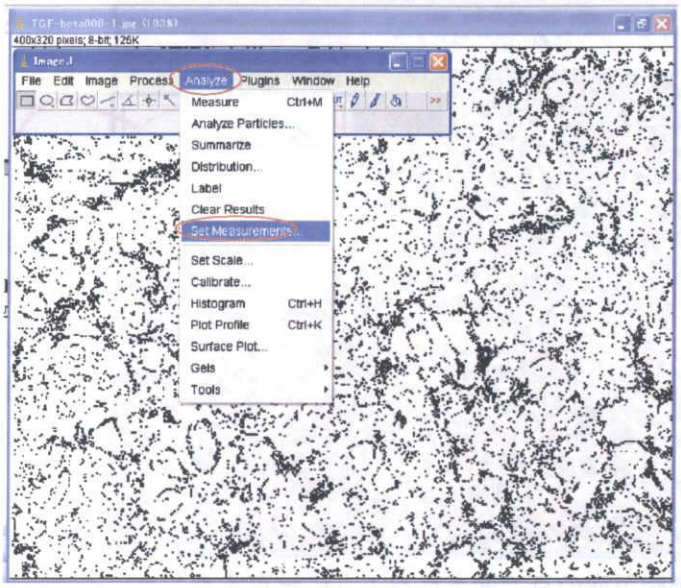


以上が前処理になる。

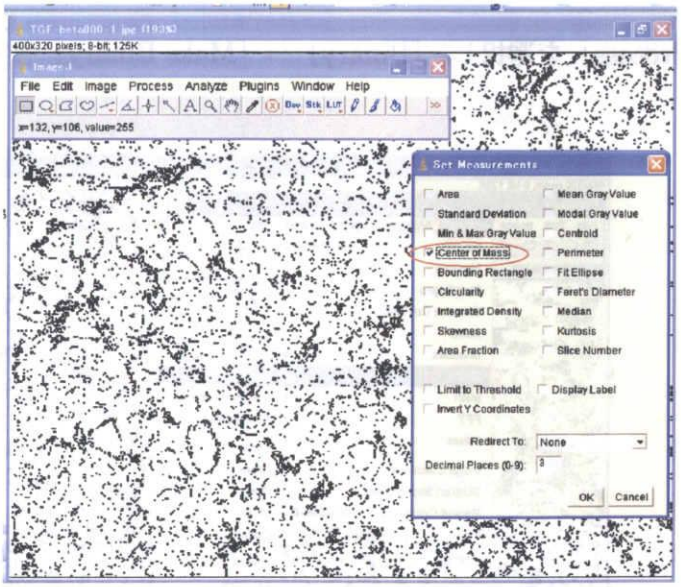
＊ 先ほどの「Threshold」で「Apply」でも実行できる

[実行]

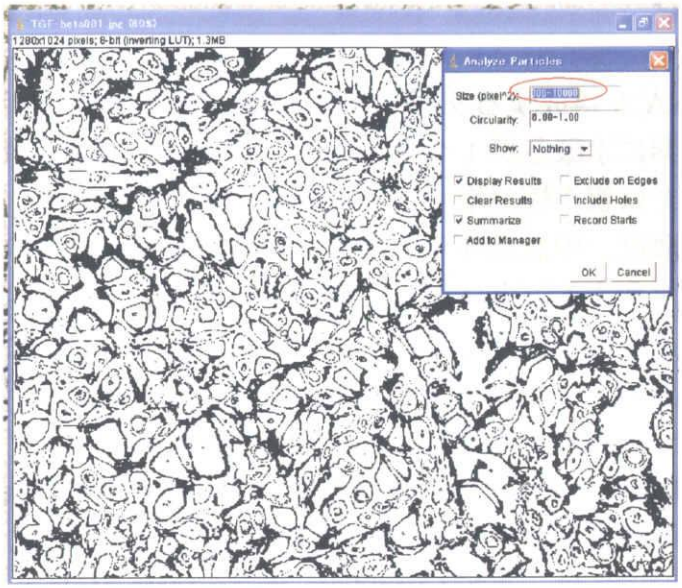
① 下処理が終わった画像を、「Analyze」→「Set measurement」を実行する。



②「Set measurement」において「Center&Mass」をチェックする。

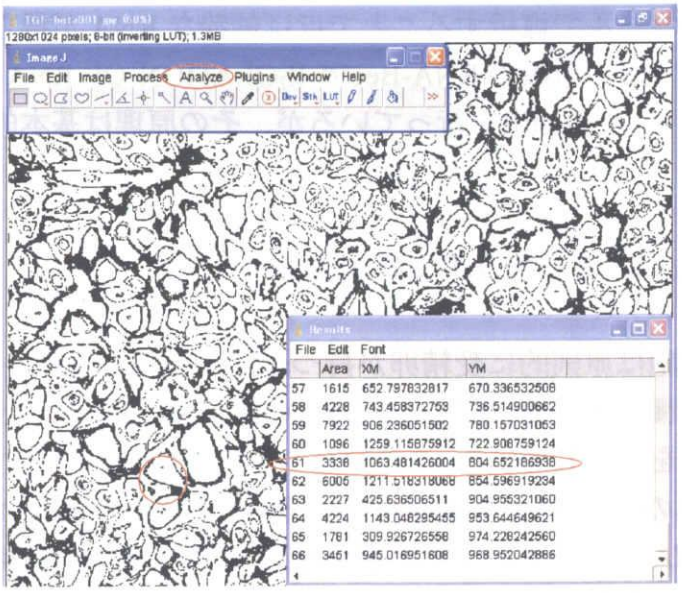


⑤「Analyze」を選択し、「Analyze particle」を選択する



＊ Size を 1000-10000 に設定する

⑥ ⑤を実行後、目的の細胞の X、Y 値を記録する



A-3 AGPC 法プロトコル（6 穴プレートの場合）

＜原理＞

RNA を構成するリボースは、DNA のデオキシリボースに比べて 2 位の炭素に水酸基が 1 つ多くある。このため DNA に比べて、次のような条件下では親水性が増すことが期待される。

核酸は、中性条件下ではリン酸基が解離して負の電荷を帯び、この部分が水和することによって高分子コロイドとして水中に分散している。ところが酸性条件下では、リン酸基の電離平衡が会合の方向に傾いてこの部分のチャージが失われるために、親水性が低下する。この状態でフェノール処理を行うと DNA は疎水性に勝るフェノール層に分配されるが、RNA はリボースの水酸基があるため水層に分配される。AGPC 法とはこの性質を利用して RNA を抽出する方法である。

一般的には、まず Guanidium thyocyanate（GTC）で RNase を失活させると同時に細胞のタンパク質を可溶化する。そして液性を酸性に保ちながらフェノール処理を行うと、タンパク質や脂質がフェノール層や中間層に移行するのみならず、DNA もフェノール層に分配される。こうして得られた水層（GTC 層）には RNA のみが溶け込んでいるので、これをアルコールで塩析することでほぼ純粋な RNA が得られるわけである。本実験では、市販の RNA-Bee™ ISOLATION OF RNA と呼ばれる試薬を用いて RNA の抽出を行っているが、その原理は基本的に同じである。

＜RNA・DNA を扱う上での注意点＞

細胞は原則的に受精卵が持つ全ての種類の遺伝子を持っているが、細胞の種類・状態に応じて、特定の遺伝子（DNA）を選択的に活性化して機能を発現している。この仲立ちをするのが mRNA である。したがって、細胞の状態をフレキシブルに変化させるためには、いつまでも古い mRNA が残っていては具合が悪い。そこで細胞や組織液中には RNA を速やかに分解する酵素（RNase）が豊富に含まれている。我々が RNA の分析を行う際には、この RNase による RNA の変性・分解が最大の障害となる。RNase は抽出する細胞の他、我々の汗・唾液・皮膚など様々な所に存在し、また熱に対する安定性も極めて高く、なかなか失活しない

（121℃の高圧蒸気滅菌にかけても活性が残る）。従って実験の成否はこのRNaseの作用をいかに防ぐかにかかっている。このことを踏まえ、今後RNA、DNAを扱う全ての実験において以下の点に気を付けること。

○ 各チューブ・チップは、素手で触れたものは使用しないこと。
○ 滅菌のために各チューブ・チップを詰め込む際は、ゴム手袋を着用し素手では絶対に触れないこと。
○ 使用するガラス器具は乾熱滅菌（RNase free）を行うこと。
○ 実験中は必ずゴム手袋（片手で良い）、マスク、帽子、白衣を着用し、無駄な会話は避けること。
○ ゴム手袋を着用した側の手は、サンプルを扱うこと以外には使用しないこと。
○ サンプルに直接触れるものを素手で扱わないこと。
○ サンプルを吸う際は、常に細心の注意を払うこと。

また、AGPC法に特有の注意点として、以下の点に気を付けること。

○ 高速遠心機は予冷運転を行っておくこと
○ 操作は全体的に素早く行うこと

＜使用機器・器具・試薬＞

- 日立微量高速遠心機（日立/CR15B型）
- DNA mini（HETO LAB EQUIPMENTID/ 872146）
- MINI CENTRIFUGE（COSTER/MVSS-06618）
- Vortex
- ウォーターバス
- 1.5mlチューブ（アシスト/72.690S）
- チューブ立て
- マイクロピペッター各種
- チップ各種
- タイマー
- Crash ice用発泡スチロール
- PARAFILM®（Pechiney Plastic Packaging, Inc./PM-996）
- 注射針（TERUMO®/NN-2432R）
- RNA-Bee™ ISOLATION OF RNA（Tel-Test, Inc./CS-104B）

- chloroform-isoamylalcohol 24:1（SIGMA/C-0549）
- isopropanol（SIGMA/I-9516）
- PBS（SIGMA/D-8537）
- 75%EtOH/DEPC 処理水溶液（無水 EtOH を DEPC 処理水で希釈）
  → 無水 EtOH（Wako/321-00025）
- DEPC 処理水
  → Diethylpyrocarbonate（CALBIOCHEM®/298711）
- Crash ice

＜AGPC 法（前半）＞

① 細胞に刺激を与え、6 穴プレートから培地を吸引し、PBS を 1ml/well 入れて細胞を洗浄する。
※ 後の行程を考慮し、3 穴または 4 穴毎に行うのが良い。
① 洗浄後 PBS を吸引し、素早く RNA-Bee™を 1ml/well 入れる。
② 2 連にしたピペットチップの先端で well 内の細胞を剥がすように掻いた後、10 回程度ピペッティングを行い、その懸濁液を 1.5ml チューブに移し入れる。
※ ②と③の操作を 5 分間で行うこと。
※ チップは well 毎に交換すること。
③ チューブに入った各サンプルに chloroform - isoamylalcohol 24:1 を 200μl ずつ加え、しっかりと蓋を閉めた後 15 回程度上下に振り混ぜる。
④ 室温（R.T）にて 15 分間静置する。
⑤ 12000G/4℃/15 分にて遠心分離を行う。
⑥ 3 層に分離するので、最上層の溶液（透明な水層、ここに RNA が含まれる）を液面近傍よりそれぞれ 350μl ずつ採取し、別に用意した 1.5ml チューブに移し入れる。
⑦ 移し入れた各サンプルに isopropanol を 500μl ずつ加え、Vortex にて撹拌した後すぐに-80℃の冷凍庫に移し一晩保存する（Over Night）。

＜AGPC 法（後半）＞

【 全て氷上操作 】

① サンプルを解凍し、12000G/4℃/10 分にて遠心分離を行う。
※ このときチューブの継ぎ手を外側に向けて遠心を行うこと。
② チューブを傾け、ある程度の上澄を慎重に取り除く。
※ 沈殿は肉眼では確認出来ないので、チューブの継ぎ手側に沈殿があると想定して上澄を取り除くこと。
③ 各サンプルに 75%EtOH/DEPC 処理水溶液を 500μl ずつ加え Vortex にて撹拌した後、10000G/4℃/5 分にて遠心分離を行う。
④ チューブを傾け、より慎重に上澄をぎりぎりまで取り除く。
⑤ チューブの口に 2.5cm 四方程度の PARAFILM®を張り、注射針にて 10 個程度の穴を開ける。
※ PARAFILM®は絶対に素手で触らないこと。
⑥ DNA mini にサンプルをセットし、減圧乾燥を行う。
※ サンプル残量によって乾燥の度合いが異なるため、乾燥し過ぎないように様子を見ながら行うこと（目安：1 セット 3～5 分）。
⑦ 各サンプルに DEPC 処理水を 10μl ずつ加え、Vortex による撹拌と MINI CENTRIFUGE による軽い遠心を 2 回繰り返す。
※ 減圧乾燥の際に RNA が陰圧で壁に付着する場合があるため、念入りに行うこと。
⑧ ウォーターバスにて 55℃/5 分加温後、冷蔵庫にて 4℃に冷却する。
⑨ 得られたサンプルは RNA の定量後、RT-PCR 法に使用する。

A-4 RNA の定量プロトコル

＜意味＞

ここでは、分光光度計を用いて吸光度 OD_{260} および OD_{280} の測定を行い、その値を基に全サンプルの RNA 濃度を一律に揃える。これにより、この後に行う PCR の反応生成物に定量性を持たせることが出来る。というのも、RT-PCR 法は mRNA を鋳型にして DNA の合成・増幅を行い、得られた DNA の定量を行うため、最初の鋳型 mRNA の量にばらつきがあると最終的な PCR 反応生成物量もばらついてしまい、定量性を失ってしまうからである。

＜注意点＞

核酸（この場合はRNA）由来の吸光度OD_{260}とそれ以外の物質（タンパク質など）由来の吸光度OD_{280}の比（OD_{260}/OD_{280}）は、サンプルのRNA純度を表しており、一般的に1.5以上が望ましいとされる。但し、いくら比が大きいとしても吸光度が低いとRNA濃度は低くなってしまうため、理想的なサンプル濃度 0.2～0.5μg/μl にするためには、少なくともOD_{260}=0.085以上は必要である。また、逆にサンプル濃度が高過ぎる場合は希釈して用いること。

＜使用機器・器具・試薬＞

- Smart Spec™ 3000 Spectrophotometer（BIO RAD/170-2501）
- Cuvette（BIO RAD/170-2505）
- MINI CENTRIFUGE（COSTER/MVSS-06618）
- Vortex
- 0.5mlチューブ（アシスト/72.699S）
- チューブ立て
- マイクロピペッター各種
- チップ各種
- キムワイプ® S-200（株式会社クレシア/62011）
- 洗瓶（脱イオン水）
- 0.1N HCl aq（Wako /080-08065)
- DEPC処理水（CALBIOCHEM/298711）

＜RNAの定量＞

① AGPC法により得られた各サンプル10μlより1μlずつ採取し、サンプル数分用意した0.5mlチューブの底部にそれぞれ入れる。
② DEPC処理水を59μlずつ①のチューブに加え、Vortexにて撹拌後MINI CENTRIFUGEにて軽く遠心を行う。
③ 前日よりHCl aq（0.1N）に浸け置いたCuvetteを、脱イオン水にてよく濯ぎ水気を切る。
④ マイクロピペッターを用いてCuvetteにDEPC処理水を60μl入れ、Smart Spec™ 3000 Spectrophotometerにセットし、零点補正（Read

Blank）を行う。

⑤ マイクロピペッターを用いて DEPC 処理水を抜き取り、1 つ目の測定サンプルを 60μl 入れ Smart Spec™ 3000 にセットし、3 回吸光度の測定（Read Sample）を行う。

⑥ 測定し終えたサンプルを、マイクロピペットを用いて抜き取り元のチューブに戻す（測定のやり直しが出来るようにするため）。

⑦ Cuvette を脱イオン水にてよく濯ぎ水気を切る。

⑧ ⑤～⑦をサンプル数分繰り返す。

⑨ 測定結果が異常であったサンプルを再測定する。

⑩ 得られたデータを出力し、データの処理を行う。

＜データの処理＞

得られたデータより、次の 2 つの計算を行う。

i ）各サンプルの濃度

ii ）全サンプルの濃度を最低のサンプル濃度に合わせるために必要なサンプルと DEPC 処理水の量

それぞれに必要な計算式を以下に示す。

- サンプル濃度(μg/μl)=(OD_{260})×(換算係数)×(希釈倍率)
- RNA の最低量(μg)=最低のサンプル濃度(μg/μl)×サンプル残量(μl)
- 必要サンプル量(μl)=RNA の最低量(μg)／希釈対象のサンプル濃度(μg/μl)
- 必要 DEPC 処理水量(μl)=サンプル残量(μl)－必要サンプル量(μl)

※ 換算係数は RNA 測定の場合 0.04（μg/μl）。

※ 本実験における希釈倍率は 60 倍。

※ 本実験におけるサンプル残量は、AGPC 法にて得られたサンプル 10μl から RNA の定量に用いた 1μl を差し引いた 9μl。

A-5 T-PCR プロトコル

＜原理＞

PCR は微量な DNA の存在を非常に鋭敏に検出できる方法であり、この方法を応用すれば極微量の mRNA の発現を検出することができる。し

かしPCR法に用いるDNA合成酵素は、mRNAを鋳型としてDNAを合成する活性を持たない。その問題の解決方法として重要となる反応が逆転写反応である。つまり、逆転写酵素を用いてmRNAを鋳型としたcDNAの合成反応（逆転写反応）を予め行えば、そのcDNAを改めて鋳型としてPCRを行うことができる。これがmRNAの発現をPCR法によって検出する方法、すなわちRT-PCR法である（Fig.A-5-1）。

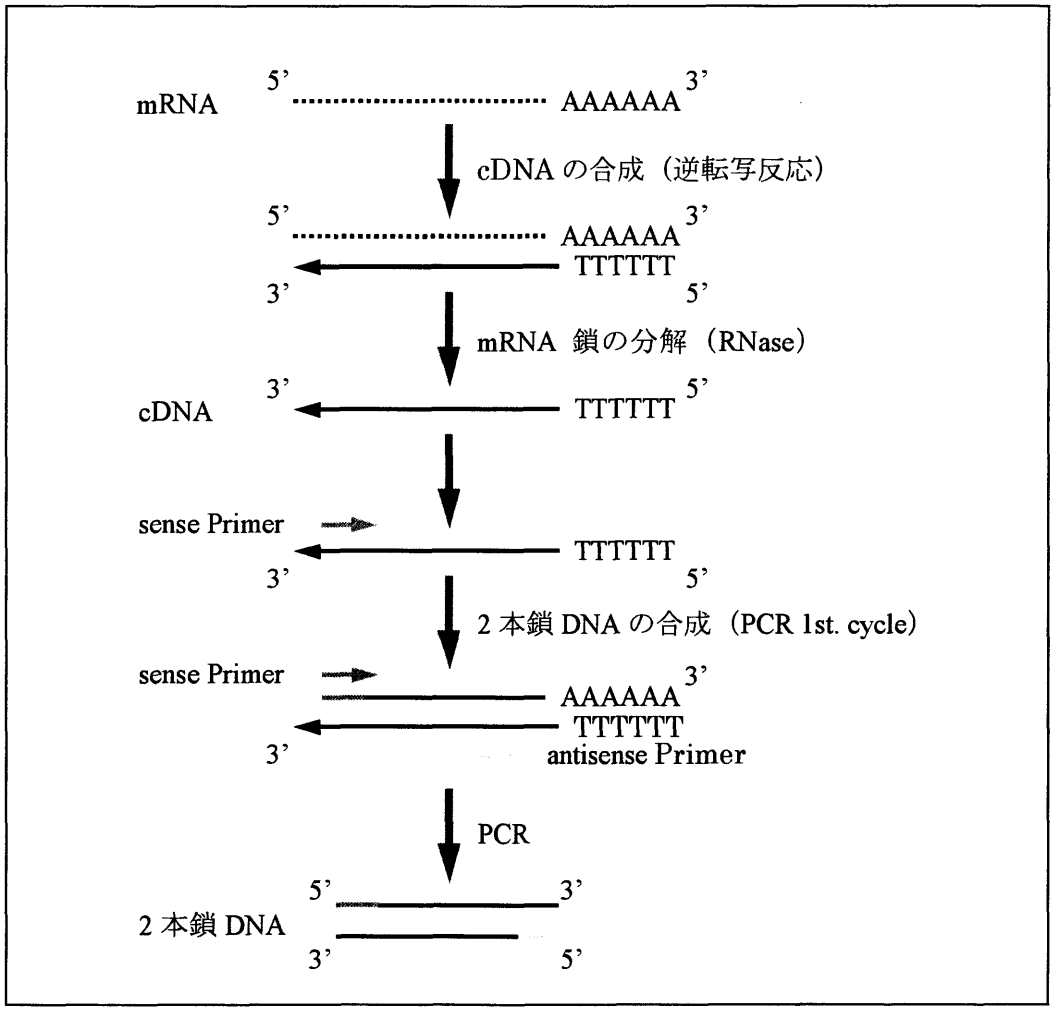


Fig.A-4-1 RT-PCR法

A-5-1. Reverse Transcription

＜原理＞

細胞から発現したmRNAにPrimer（Random Hexamer）を結合させ、逆転写酵素を用いてmRNAに相補的な1本鎖DNA（cDNA）を逆転写反応

により合成する。この時点ではDNAとRNAが繋がった2本鎖の状態であり、安定性が高いため、PCRの熱変性（denature）時に十分に1本鎖にならないことがある。そのため、DNA鎖と対を成しているmRNA鎖を、RNA分解酵素（RNase）を用いて分解する。これにより完全長cDNAを合成することができる（Fig.A-5-1）。

＜注意点＞

注意すべきことは、とにかくRNaseの混入を防ぐことである。詳しくはA-3AGPC法プロトコルを参照のこと。また、RT法に特有の注意点として以下の点に気を付けること。

○ PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEMにRT program 01/02を予め入力しておくこと。
○ Reaction Tube with Capは必ず専用の滅菌缶に入れ滅菌しておくこと。その際も素手では触れないこと。
○ Reaction Tube with Capにラベルする際は、分かりやすく、かつ消えない箇所に記入すること。
○ Reaction Tube with Capは他のものと比べて脆く、力を入れ過ぎると破損する恐れがあるので注意すること。

＜使用機器・器具・試薬＞

- PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM（ASTEC/PC-708）
- MINI CENTRIFUGE（COSTER/MVSS-06618）
- Vortex
- Reaction Tube with Cap（MicroAmp/N801-0540）
- チューブ立て
- マイクロピペッター各種
- チップ各種
- Crash ice用発泡スチロール
- Random Primers（Invitrogen/48190-011）
- dATP （Amersham Biosciences/27-2050-01）
- dTTP （Amersham Biosciences/272080）
- dCTP （Amersham Biosciences/272060）
- dGTP （Amersham Biosciences/272070）
- 10x PCR buffer（PERKIN ELMER/E12387）
- Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor（Promega/N2511）

- Super Script™ RNase H⁻ Reverse Transcriptase（Invitrogen/18053-017）
- DTT（Invitrogen/Y00147）
- DEPC 処理水（CALBIOCHEM/298711）
- Crash ice

＜RT Master Mix＞

【 全て氷上操作 】

Table.A-5-1 に従い、各試薬を混合し RT Master Mix を作製する。極微量を扱うため、サンプル数丁度の量では RT Master Mix が不足する恐れがある。そのためサンプル数が多い場合は 1、2 サンプル分余分に作製すること。また、Table.A-5-2 に後で加える RNase inhibitor と Super Script™の必要量も示す。

Table.A-5-1 RT Master Mix（単位:μl）

Sample 数	1	6 (+1)	9 (+2)	12 (+2)	18 (+3)	24 (+4)
Random Primers (100mM)	1	7	11	14	21	28
dATP (2.5mM)	1	7	11	14	21	28
dTTP (2.5mM)	1	7	11	14	21	28
dCTP (2.5mM)	1	7	11	14	21	28
dGTP (2.5mM)	1	7	11	14	21	28
10x PCR buffer	2	14	22	28	42	56
DTT	2	14	22	28	42	56
合　　計	9	63	99	126	189	252

Table.A-5-2RNase inhibitor と Super Script™の必要量（単位:μl）

Sample 数	1	6 (+1)	9 (+2)	12 (+2)	18 (+3)	24 (+4)
RNase inhibitor	1	7	11	14	21	28
Super Script™	1	7	11	14	21	28
合　　計	2	14	22	28	42	56

＜Reverse Transcription＞

【 全て氷上操作 】

① 各サンプルを扱う前にRT Master Mixを作製する。
② RNAの定量結果に基づき、AGPC法により得られた各サンプル原液をReaction Tube with Cap内で希釈し、9μlとする。
③ 希釈後の各サンプル9μlに、RT Master Mixを9μlずつ加え、Vortexによる撹拌とMINI CENTRIFUGEによる軽い遠心を行う。
④ PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEMにサンプルをセットし、RT program 01を実行する（B-5. RT/PCR program参照）。
⑤ 各サンプルにRNase inhibitorとSuper Script™を1μlずつ加える。
※ 予め2液を混合したものを2μlずつ加えても良いが、その場合は混合液の量を4サンプル分程度多めに作製しておくこと。
⑥ PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEMにサンプルをセットし、RT program 02を実行する（B-5. RT/PCR program参照）。
⑦ 作成したRT productは-20℃の冷凍庫にて保存する（数ヶ月保存可）。

A-5-2. Polymerase Chain Reaction

＜原理＞

PCRの原理は3段階から成るDNAの合成反応を繰り返して行うことにある。まず、鋳型となる2本鎖DNAを加熱して変性し、1本鎖にする（denature）。次に、増幅したい特定部位のDNA鎖の両端に相補的な2種類のオリゴヌクレオチドプライマーを反応系に過剰に加えた状態で温度を下げると、プライマーがDNA鎖の相補的な部位と2本鎖を形成する（annealing）。この状態でDNA合成基質のデオキシヌクレオシド3リン酸とDNAポリメラーゼを作用させると、ポリメラーゼはプライマー部位からDNA相補鎖を合成していく（extension）。ここで重要なのは、最初の2サイクルでは長さが不定な2本鎖DNAが合成されるが、3サイクル目からはプライマー対に挟まれた部位の長さの揃った2本鎖DNAが合成され、その数が急速に増えていくということである。また、1回目の合成反応で生成したDNAは次の反応の鋳型となるため、その名称の通り連鎖反応的にDNAが合成されることから、20～30サイクルの反応の後には、もとの鋳型DNA中の必要な部分配列をもつDNA分子を莫大な数得ることが出来る（Fig.A-5-2）。

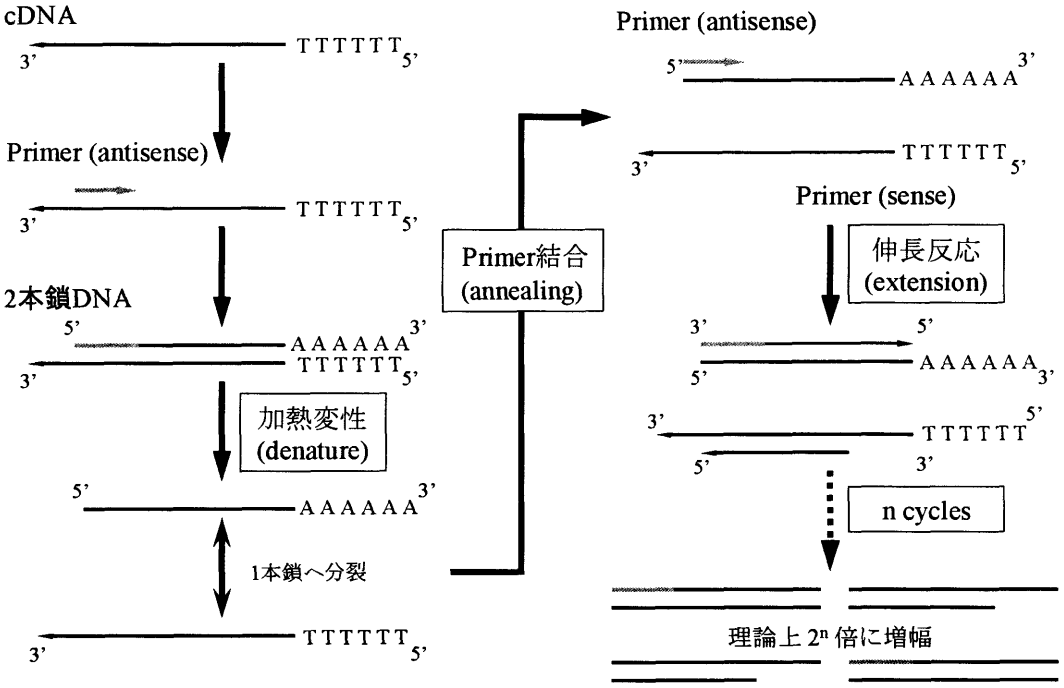


Fig.A-5-2 PCR の原理

＜PCR のカイネティクスとサイクル数＞

ここでは、PCR によって得られる反応生成物の量と PCR のサイクル数の関係について論ずる。PCR は 1 サイクルの反応によって目的とする DNA 断片が最大 2 倍に増えるため、初期鋳型量を I_0 とすると、n サイクル後の反応生成物量 I は、理想的には次式（Eq.A-5-1）に従って指数関数的に増加する。

$$I = I_0 \times 2^n \quad \cdots\cdots \quad \text{(Eq.A-5-1)}$$

しかしサイクル毎の増幅は、プライマーのアニーリング効率や DNA 鎖の伸長反応の効率が 100%ではないことなどの要因によって、必ずしも 2 倍にならない。このことを考慮すると、n サイクル毎の瞬間増加率を E' とした場合は、反応速度を dI/dn とした次の微分方程式（Eq.A-5-2）で与えられる。

$$dI/dn = E' \times I \quad \cdots\cdots \quad \text{(Eq.A-5-2)}$$

仮に E'がほぼ一定の値をとると考えて、E'を定数として Eq.A-5-2 を解くと、単純に次式（Eq.A-5-3）が得られる。

$$I = I_0 \times E^n \quad (※E = e^{E'}) \quad \cdots\cdots \quad \text{(Eq.A-5-3)}$$

これにより、PCR 反応生成物は増幅率を E として指数関数的に増加することが期待される。ここで、実際の PCR でも反応生成物がある程度蓄積するまでは、反応生成物は概ね指数関数的に増加しており、その指数関数的に増加している部分のデータを元に片対数で直線近似を行うと、

Fig.A-5-3 のようなグラフが得られる。これによると反応生成物が蓄積するまでは、Eq.A-5-3 において増幅率 E を一定とみなしたモデルが妥当であることが分かる。

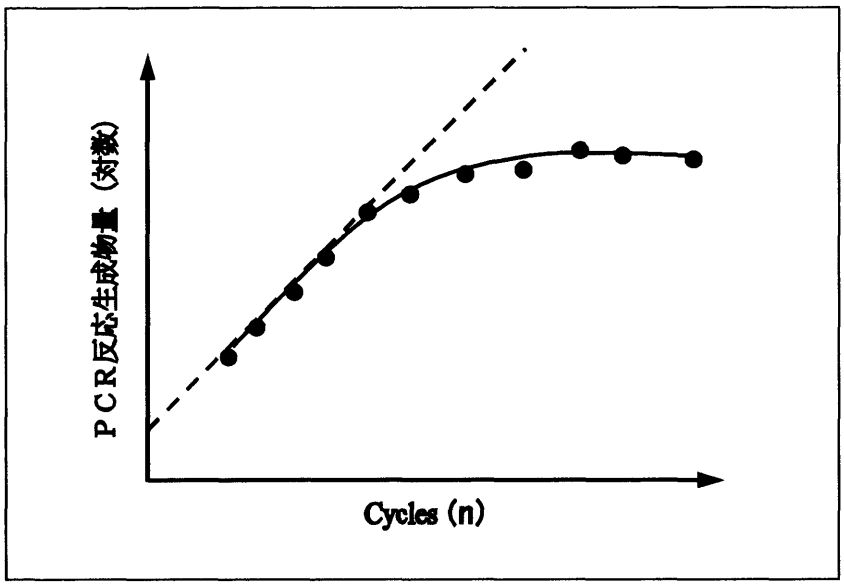


Fig.A-5-3 PCR 反応生成物量とサイクル数

しかし、反応が進んで生成物量が増加するにつれて増幅率は低下し、最終的には反応生成物量の増加は頭打ちとなり、一定の値をとるようになる。反応が停止する要因としては次の 5 つが挙げられる。

i） Taq DNA polymerase の失活
ii） 反応基質（デオキシヌクレオシド三リン酸）の枯渇
iii） プライマーの枯渇
iv） 反応副産物であるピロリン酸による合成反応阻害
v） 生成した DNA 鎖同士の再会合によるプライミングの阻害

i）に関しては、同じサイクル数でも反応生成物量の増加が頭打ちになる場合とそうでない場合があることや、一度頭打ちになった反応液にさらに酵素を追加しても通常は反応が進行しないことから、通常の PCR サイクル数（25～30 サイクル）においては主たる限定要因にはなっていないものと考えられる。また、ii）～v）の限定要因については、その効果が反応生成物量に概ね比例するものと考えることが出来る。

以上のことを考慮すれば、一般的に PCR のサイクル数は 30 サイクル前後が良いと言える。もし30サイクルで十分な増幅が見られない場合は、35 サイクル程度までサイクル数を増やしてみると良い。

＜反応温度と反応時間＞

非常に繊細な反応であるPCRは、わずかな温度やサイクル数の変化が反応の成否を分けると言っても過言ではない。ここでは、PCRの各段階における一般的な反応温度と反応時間について論ずる。

ｉ）熱変性（denature）の温度と時間

熱変性は94℃×30秒～1分を標準とするが、液量が少ないために反応液の温度がすぐに高温に達するような場合は、30秒以下でも十分な場合がある。ちなみに93℃でも十分な場合が多いが、94℃まで上げておいた方が無難である。また、反応時間が長すぎると、酵素が失活してしまう点にも注意が必要である。

ii）アニーリング（annealing）の温度と時間

アニーリング温度はプライマーのTm（次項 ＜Primer＞ 参照）に留意して設定する。時間は通常1分で良い。目的とする標的配列以外の非特異的配列が増えるようなら、2℃間隔で温度を上げてみる。全く何も増幅されないようなら、2℃間隔で温度を下げてみると良い。

iii）伸長反応（extension）の温度と時間

伸長反応は通常72℃で行う。伸長時間は標的配列の長さによって異なり、1000bp以下の場合は1分で十分だが、それよりも長い配列の場合には1000bpにつき1分の割合で長くする。

＜Primer＞

ここにプライマーの選択のための条件を挙げる。自らプライマーを設計する場合はこれらの点に気を付けなくてはならない。

ｉ）プライマーの長さ

標準的なプライマーは18～28塩基対であり、中でも20～24塩基対が望ましいとされている。通常この位の長さであれば、鋳型DNAとの特異的なアニーリングに十分であると考えられている。

ii）CG含有量

プライマー内でG/C塩基とA/C塩基がほぼ均一になるように設計することが望ましく、標準的なCG含有量は50%である。また、プライマーの3'端でのAT含有量が多くならないようにする。

iii）Tm値

Tm（Melting Temperature）とは、PCRにおいてDNAの2本鎖が熱変性（denature）して1本鎖になる温度のことであり、標準的には55

～80℃である。合成する 2 つのプライマーの Tm 値は同じであることが望ましいと考えられている。Tm 値は A と T では 2℃、C と G では 4℃を目安に計算する。いくつかのプライマーの候補がある場合、通常 Tm の高いものを選ぶ。

iv）プライマー間の相補性

2 つのプライマーの、特に 3'端の間で相補性のないようにする。プライマー同士ダイマー（2 量体）を形成すると、PCR の効率が低下するためである。

v）プライマー内の二次構造

プライマー内で二次構造をとらないようにする。これは PCR を阻害するばかりでなく、プライマーを独自に合成する際の効率にも影響すると考えられるからである。

＜注意点＞

注意すべきことは、とにかく RNase の混入を防ぐことである。詳しくは A-4. AGPC 法プロトコルを参照のこと。また、PCR 法に特有の注意点として以下の点に気を付けること。

○ PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM に各プライマーに対応した PCR program を予め入力しておくこと。
○ サイクル数を上下させる場合は 4 サイクル刻みで増減させ、2 サイクル刻みで微調整すること。
○ RT product 内に白い沈殿がある場合は、cDNA が壊れてしまっている可能性が高い。そのサンプルで PCR を行っても、結果が得られない場合が多いので注意すること。
○ RT 法と同様、Reaction Tube with Cap の扱いに気を付けること。

＜使用機器・器具・試薬＞

- PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM（ASTEC/PC-708）
- MINI CENTRIFUGE（COSTER/MVSS-06618）
- Vortex
- Reaction Tube with Cap（MicroAmp/N801-0540）
- チューブ立て
- マイクロピペッター各種
- チップ各種
- Crash ice 用発泡スチロール

- dATP（Amersham Biosciences/27-2050-01）
- dTTP（Amersham Biosciences/272080）
- dCTP（Amersham Biosciences/272060）
- dGTP（Amersham Biosciences/272070）
- Primer (sense/antisense)各種
- AmpliTaq Gold™（Applied Biosystems/N808-0242）
- 10x PCR buffer（PERKIN ELMER/E12387）
- DEPC 処理水（CALBIOCHEM/298711）
- Crash ice

＜PCR Master Mix＞

【 全て氷上操作 】

Table.A-5-3 に従い、各試薬を混合し PCR Master Mix を作製する。プライマーは目的に応じて変更する（B-4. Primer List 参照）。RT Master Mix と同様に、サンプル数が多い場合は1、2サンプル分余分に PCR Master Mix を作製すること。また、AmpliTaq Gold™は各サンプルに加える直前に添加すること。

Table.A-5-3 PCR Master Mix（単位:μl）

Sample 数	1	6 (+1)	9 (+2)	12 (+2)	18 (+3)	24 (+4)
dATP (2.5mM)	1	7	11	14	21	28
dTTP (2.5mM)	1	7	11	14	21	28
dCTP (2.5mM)	1	7	11	14	21	28
dGTP (2.5mM)	1	7	11	14	21	28
Primer (sense) (20μM)	1.25	8.75	11.25	17.5	26.25	35
Primer (antisense) (20μM)	1.25	8.75	11.25	17.5	26.25	35
10x PCR buffer	5	35	55	70	105	140
DEPC 処理水	36.25	253.75	398.75	507.5	761.25	1015
AmpliTaq Gold™	0.25	1.75	2.75	3.5	5.25	7
合　　計	48	336	528	672	1008	1344

＜Polymerase Chain Reaction＞

【 全て氷上操作 】

① 各サンプルを扱う直前にPCR Master Mix（AmpliTaq Gold™抜き）を作製する。
② RT法により作製した各RT productから2μlずつ採取し、予め用意しておいたReaction Tube with Capに移し入れる。
③ PCR Master MixにAmpliTaq Gold™を加え、Vortexによる撹拌とMINI CENTRIFUGEによる軽い遠心を行う。
④ ②で用意したチューブにPCR Master Mixを48μlずつ加え、Vortexによる撹拌とMINI CENTRIFUGEにて1分間遠心を行う。
※ GeneAmp® PCR system 2400（サーマルサイクラー）を使用する場合、PCR中にサンプルが蒸発して組成が変化するのを防ぐため、この時点で各サンプルの液面にMINERAL OIL（SIGMA／M5904）を50μlずつ壁伝いにゆっくりと流し込む。
⑤ PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEMにサンプルをセットし、各プライマーに合ったPCR programを実行する（B-5. RT/PCR program参照）。
⑥ 作成したPCR productは-20℃の冷凍庫にて保存する（数ヶ月保存可）。

A-5-3. Gel Electrophoresis

＜原理＞

核酸やタンパク質などの生体高分子を分析する手段として、電気泳動法は極めて有効な技術の一つである。電解液を含むアガロースやポリアクリルアミドなどのゲルに電場をかけると、その中を荷電粒子が移動する。このとき荷電粒子の大きさ、形、荷電量などの違いによって、粒子の移動速度に差が生じる。この移動速度の差を利用して様々な分子を分離する方法が電気泳動法である。

核酸を構成しているヌクレオチドは、塩基とリン酸基が電離して電荷を帯び易い。2本鎖DNAの場合、塩基の電荷は相補鎖間の水素結合で互いに打ち消し合っているため、分子全体としてはリン酸基のマイナス電荷のみが主となる。また、このリン酸基の個数（荷電）はヌクレオチド数（DNAの分子量）に比例するため、全てのDNA分子は質量あたり一

定の力で引かれることになる。さらに、こうして 2 重螺旋構造をとっているDNAは塩基配列に関わらず同じ線状分子の形をしており、立体構造は泳動度にほとんど影響を与えない。即ち、唯一泳動度に影響を与えるのが分子の大きさ（長さ）ということになる。

鎖状分子のDNAはゲルマトリックスの網の目の隙間を移動する際、分子量の大きな長い分子ほどマトリックスへの引っ掛かり（マトリックス分子との相互作用）が増えるため泳動速度が遅くなる。従って、2 本鎖DNAの電気泳動の場合、DNAの塩基配列に関係なく、DNA鎖の長さのみに依存した電気泳動パターン（即ち、長いものほど泳動距離が短い）が得られる。

＜注意点＞

AGPC法、RT法、PCR法に比べそれほど神経質にならなくても良いが、ゴム手袋（両手がbetter）と白衣は必ず着用すること。RNaseの混入を防ぐ意味もあるが、ここではむしろEthidium Bromideから身を守るためにあると言っても良い。

☣ Ethidium Bromide

Ethidium Bromideは核酸のバンド検出に用いられる蛍光試薬であり、2 本鎖 DNA の鎖の間に挿入（インターカレーション）されるという性質上、DNA の正常な複製や転写を妨げ、突然変異誘起させるという効果から強力な発癌作用と毒性が生まれる。取り扱いには必ずゴム手袋をはめ、粉末の計量にはマスクを着用すること。また、Ethidium Bromideを含んだ泳動用bufferなどの廃液やアガロースゲル、廃チップや廃ビンは必ず他のものと区別して集め、適切な処置を施してから廃棄すること。もしくは業者に委託して廃棄してもらうこと。

また、電気泳動に特有の注意点として、以下の点に気を付けること。

○ 使用する三角フラスコとメスシリンダーは口にアルミホイルで蓋をし、180℃、8 時間以上（Over Night）乾熱滅菌を行うこと。

＜使用機器・器具・試薬＞

- Wide Mini-Sub Cell® GT System（BIO RAD/ 170-4485）
- POWER PAC 300（BIO RAD/282 BR 11443）
- LIBROR（株式会社 島津製作所/AEL-200）

- 電子レンジ
- ゲル作成用三角フラスコ（100ml）
- メスシリンダー（100ml）
- マイクロピペッター各種
- チップ各種
- アルミホイル
- サランラップ
- PARAFILM®（Pechiney Plastic Packaging, Inc./PM-996）
- フライ返し
- NuSieve® GTG® Agarose（BMA/50080）
- Ultra Pure Agarose（Invitrogen/15510-019）
- 50x TAE buffer（INTERGEN/S4300）
- 10x TAE buffer（Invitrogen/15558-042）
- Ethidium Bromide（SIGMA/E-1510）
- Blue Juice™（Invitrogen/10816-015）
- 123 bp DNA Ladder（Invitrogen/15613-011）
- DEPC 処理水（CALBIOCHEM/298711）

＜Agarose Gel（3% wt/vol）の作製＞

① Wide Mini-Sub Cell® GT System の Gel caster にゲルトレイをセットし、水準器を用いてゲルトレイが地面に対し水平になるよう調整する。

② NuSieve® GTG® Agarose と Ultra Pure Agarose を秤量し、乾熱滅菌済みのゲル作成用三角フラスコに入れる（Table.A-5-4）。

※ 秤量には薬包紙ではなく、乾熱滅菌した三角フラスコの口を包んでいたアルミホイルを用いること。また、アルミホイルの内側は素手で触らないこと。

※ 秤量にはスパチュラを用いないこと。

③ 50x TAE buffer を乾熱滅菌済みのメスシリンダーに入れ、DEPC 処理水を所定量加えて 50 倍に希釈し 1x TAE buffer (from 50x)を作製する（Table.A-5-4）。

Table.A-5-4 Agarose Gel（3% wt/vol）作製に必要な各試薬の量

Ultra Pure Agarose (g)	0.6	DEPC 処理水 (ml)	58.8
合　　計 (g)	1.8	合　　計 (ml)	60
NuSieve® GTG® Agarose (g)	1.2	50x TAE buffer (ml)	1.2

④ ②の三角フラスコに③で調整した 1x TAE buffer (from 50x)を加え、ゲルの塊が出来ないように振り混ぜた後、buffer の蒸発を防ぐためサランラップでフラスコの口を閉じ、電子レンジを用いて加熱しアガロースを溶解させる。

※ 細かい気泡が出なくなり、完全に透明になるまで加熱すること。

※ 急騰防止のため、様子を見ながら行うこと（目安:1 分毎に止める）。

※ 加熱し過ぎで buffer が多量に蒸発した場合、ゲルの濃度が変わってしまうため 1x TAE buffer (from 50x)を適量加えること。

⑤ 完全に溶解させたアガロース溶液に Ethidium Bromide を 6.0μl 加えてよく振り混ぜた後、ゲルトレイに気泡が出来ないようにゆっくりと流し入れ、気泡が付着しないようにコームをセットする。

⑥ 10 分程度静置しゲルを固めた後、10x TAE buffer を DEPC 処理水で 10 倍に希釈して作製した 1x TAE buffer (from 10x)にてゲル表面を浸し、冷蔵庫に 10 分程度入れて完全に固める。

＜Gel Electrophoresis＞

① 水準器を用いて、地面に対して水平になるように調整した Wide Mini-Sub Cell® GT System の泳動槽に、1x TAE buffer (from 10x)を 600ml、Ethidium Bromide を 20μl 加える。

② 完全に固まったゲルからコームを慎重に抜き取り、サンプル側が陰極となるようゲルトレイごと泳動槽に移し入れる。

※ ゲル本体及び穴が崩れた場合は作り直すこと。

③ PARAFILM®を 20cm 程度切り出し、その上に Blue Juice™を 3μl ずつ滴下する。

※ Blue Juice™はすぐに乾燥してしまうため、1 度に全サンプル分を滴下しない方が良い。

④ 123 bp DNA Ladder（3μl）は、Blue Juice™（3μl）及び 1x TAE buffer (from 50x)（3μl）と混合し、ピペッティング後にゲルの所定の穴に静かに流し込む。

⑤ 各 PCR product から 10μl ずつサンプルを採取し、Blue Juice™（3μl）に加えた後ピペッティングを行い、ゲルの所定の穴に静かに流し込む。

⑥ Positive Control を 10μl 採取し、所定の位置の Blue Juice™（3μl）に加えた後ピペッティングを行い、ゲルの所定の穴に静かに流し込む。

※ 混合後の溶液（13μl）は残さず吸い取り、流し込むこと。

⑦ 電流がゲル内を真直ぐに流れるようにゲルトレイの位置を調整する。
⑧ 電極を取り付け POWER PAC 300 に接続した後、80V 80mA 70 分の条件で泳動を開始する。

A-5-4. PCR 反応生成物の確認と定量化

＜原理＞

核酸は 280nm 付近の波長に吸収ピークがある。この核酸の UV 光を吸収する性質は、対象となる 2 本鎖 DNA の内部に Ethidium Bromide 分子を挿入（インターカレート）することで PCR 反応生成物の確認に応用することが出来る。即ち、核酸（ここでは 2 本鎖 DNA）に吸収された 280nm の UV 光が Ethidium Bromide 分子にエネルギー転移されると、励起されて 590nm の蛍光を放射する。Ethidium Bromide 本来の吸収は 300nm なので、この 300nm の波長をあまり含まず、280nm 付近の波長を豊富に含む UV 光で Ethidium Bromide 染色を行ったゲルを照らすと、遊離した Ethidium Bromide 分子は励起されず、インターカレートした分子のみが DNA からのエネルギー転移により励起されて蛍光を発する。つまり、ゲル中で 2 本鎖 DNA が存在する部分のみが光るということになる。この蛍光強度は概ねインターカレートした Ethidium Bromide 分子の個数に比例し、また、インターカレーションは 2 本鎖 DNA の量（長さ×本数）に比例して起こるため、蛍光強度を測定することでゲル中の DNA 量を推定することが可能になる。但し、測定する 2 本鎖 DNA が全て十分量の Ethidium Bromide と結合し、飽和していなければ、その定量は意味を成さないので注意しなくてはならない。

＜内部標準＞

内部標準とは、それぞれ検出したサンプル量を補正するために必要となる基準のことである。定量的 PCR 一般において一義的に明らかにされることは、反応系に加えたサンプルに含まれる目的 DNA の相対量であり、絶対量ではない。その絶対量を知るためには、予め絶対量の分かっている DNA で標準サンプルを調整して PCR を行い、目的 DNA と標準サンプルとの相対量を比較する必要がある。この標準となるものを内部標準という。本研究で用いた GAPDH（グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素）は house keeping gene の一種であり、組織によって発現量に差がないため内部標準として用いることが出来る。また、GAPDH の他にも α-actin や β-actin なども内部標準としてよく用いられる。

— 補正の具体例 —

2つのサンプルA、Bと遺伝子X（目的物）、内部標準遺伝子Nを考える。AとBそれぞれにおけるXの発現量を比較する場合

i）遺伝子Xの定量結果 A : B = a : b だけではA中のXはB中のXのa/b倍多い（もしくは少ない）量が入っているという「相対量」しか分からない。

ii）ところが、絶対量が分かっている内部標準遺伝子Nの定量結果 A : B = m : n からA中のNとB中のNそれぞれの絶対量m、nを知ることが出来る。また、A中のNとB中のNそれぞれの相対量（m/n倍多い、少ない）も知ることが出来る。

iii）そこで、i）で分かったXの相対量を、ii）で分かったNの絶対量で補正すればXの発現量の絶対量a/mとb/nを求めることが出来る（Table.A-5-5）。

Table.A-5-5 目的遺伝子の相対量と絶対量

	A	B	量
目的遺伝子Xの相対値	a	b	相対量
内部標準遺伝子Nの相対値	m	n	絶対量
Nで補正したXの相対値	a/m	b/n	

＜注意点＞

ここでもEthidium Bromide汚染の危険性があるため、その扱いには十分注意すること。また、PCR反応生成物の確認と定量化に特有の注意点として、以下の点に気を付けること。

○ ゲルは折れやすいため、無理な力を加えないこと。
○ ゲルをイメージアナライザーに付属のプレートに移す際は、隙間に気泡を入れないこと。
○ フロッピーディスクに画像データ（jpeg型式）を記録する際は、自動的にファイル名が連番の番号のみとなるため、大量に撮影する場合はどの画像がどの結果なのか確認できるようにしておくこと。

＜使用機器・器具・試薬＞

- イメージアナライザー一式（TOYOBO/FAS-Ⅲ）
- Gel-Pro® Analyzer Version 3.1 for Windows™ （Media Cybernetics®/50N31000-11851）
- パーソナルコンピュータ
- フロッピーディスク （Windows®フォーマットのもの）
- サランラップ

＜PCR 反応生成物の確認＞

① 電気泳動終了後、ゲルをイメージアナライザーに付属のプレートに移してセットした後、モニタに写ったゲルの位置、被写体の大きさを調整し、カメラのフォーカスを合わせる。

② UV トランスイルミネーターより UV 光を照射し、バンドの確認を行う。

③ 鮮明なバンドの確認が出来た場合、露光時間を変えて数パターンの写真を撮影し、付属のドライブよりフロッピーディスクに画像データ（jpeg 型式）を記録する。

④ Positive Control を含め、バンドが確認できなかった場合は、作製したゲルや電気泳動操作に問題があったと考えもう一度やり直す。

⑤ 記録した画像データをパソコンに移し、画像解析ソフト Gel-Pro® Analyzer Version 3.1 for Windows™を用いてバンドの解析を行う。

＜データの扱い・処理＞

画像解析ソフト Gel-Pro® Analyzer Version 3.1 for Windows™を用いて以下の 2 点を解析する。尚、解析操作はソフトに付属の取扱説明書に従って行う。

i）サイズマーカーと比較し、PCR 反応生成物の Size（bp）を解析する。

ii）各泳動レーン内の目的のバンドを選定し、バンドの輝度（max.OD）を測定する。

得られた各データ値は内部標準のデータ値で除し、control を 1 として補正する。

A-6. ウェスタンブロット法

◎測定の原理

・BCA 法

蛋白はアルカリ溶液中で 2 価の銅イオンに作用し、1 価の銅を生成させます。この 1 価の銅イオンが 2 分子の BCA（Bicinchoninic Acid)分子と錯体を形成し紫紅色を発します。その際の吸光度を測定することでタンパク質濃度を求める

・SDS－PAGE

SDS は水溶性タンパク質 1g 当たり約 1.4g 結合して SDS-タンパク質複合体を形成します。タンパク質分子自身が持つ電荷は SDS との結合によってほとんど打ち消されている。また、還元剤である 2－メルカプトエタノールによってタンパク質の S-S 結合（ジスルフィド結合）が切断され、SDS が結合したタンパク質の形状はほぼ直鎖状になっているため、タンパク質分子の本来の形状は移動速度に影響を及ぼさない。これらのことから、ゲル内でのタンパク質の移動のしやすさは分子の大きさとそれに比例した負電荷の量にのみ左右され、分子量に従って分離することができる。

・ウェスタンブロッティング

濾紙の間にゲル、膜を挟み、電圧をかけることでタンパク質を電気的にゲルから膜へ転写する方法。

・化学発光検出

化学発光は化学反応によって生じたエネルギーが光に変換されて起こるもので、その中でもアルカリ条件下における HRP と過酸化水素によって触媒されるルミノール酸化反応がある。ルミノールは酸化されると直ちに励起状態となり、基底状態へと減衰する過程で光を放ちます。ECL 反応はフェノール環を持つ化合物などのエンハンサーの存在下で HRP によってルミノールが酸化されたときに起こる。

A-6-1. 細胞からタンパク質の抽出

＜使用機器・器具・試薬＞

・6穴プレート（住友ベークライト/NS80060）
・高速冷却遠心機(HIMAC CR15B,BIO-RAD)
・PBS（SIGMA/D8537）
・HEPES（Wako/340-01371）
・protease inhibitor（SIGMA/P8340-1ML）
・phosphatase inhibitor （SIGMA/P5726-1ML）

＜操作＞

① confluentの75cm^2 flaskの培地を吸引し、PBS10mlで十分に洗浄する。

※氷上で行う

② 細胞溶解液(0.1% TritonX-100を含む20mM HEPES-NaOH , pH7.2)をフラスコに1.0ml加える。
③ protease inhibitor、phosphatase inhibitorをそれぞれ5μl加える。
④ 25~37℃で5~20分間、軽く振盪しながらインキュベートし、細胞膜を溶解させる。
⑤ セルスクレーパーで細胞を剥離し(または強くピペッティング)、1.5ml tubeに移す。
⑥ 冷却遠心機で15,000rpm、30分間、遠心する。
⑦ 上澄み液をアシストチューブに移す。

※ 抽出したタンパク質は冷凍保存(-20℃)可能

A-6-2. タンパク質の定量(BCA 法)

＜使用機器・器具・試薬＞

- Spectrophotometer (SmartSpec^{TM}Plus, BIO-RAD)
- ビシンコニン酸（ナカライテスク/04841-54）
- 酒石酸ナトリウム（Wako/197-13975）
- Na_2CO_3（Wako/196-01595）
- NaOH（Wako /196-05635）
- $NaHCO_3$（Wako/191-01305）
- 硫酸銅(Ⅱ)5 水和物（Wako/033-04415）

＜操作＞

① A溶液、B溶液をそれぞれ作製する。

・A溶液 (数ヶ月室温保存)

ビシンコニン酸	1g	100ml にメスアップ後 NaOH を加え、pH11.25 にする。
酒石酸ナトリウム	0.16g	
Na_2CO_3	2g	
NaOH	0.4g	
$NaHCO_3$	0.95g	
DW	適量	

・B溶液 (室温保存)

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	4g
DW	100ml

② スタンダード(1mg/mA　BSA)を作製し、下表のように加える。

1mg/ml BSA (μl)	DW (μl)	試験管1本当たりのBSA量 (μl)
0	10	0
2	8	2
4	6	4
6	4	6
8	2	8
10	0	10

③ A溶液とB溶液を50：1で混合する。
④ サンプルとスタンダードをそれぞれ10μlずつアシストチューブにとり(各サンプル2本ずつ)、③で作製した溶液を100μずつ加える。
⑤ ボルテックスで攪拌する。
⑥ 37℃、30分で静置する。
⑦ OD_{562}を測定する。
⑧ タンパク質濃度を横軸、吸光度を縦軸にとり、検量線を作り、総タンパク質量を測定する。

＊Spectrophotometer (SmartSpec^{TM}Plus, BIO-RAD) 操作方法

1. 電源を入れる
2. λを押す
3. enterを押す (波長の読み取り 1)
4. 波長を562nmに設定する
5. enterを押す (バックグラウンド読み取りをひきますか No)
6. select → enterを押す (繰り返して読むサンプルはありますか YES)
7. enterを押す (試料の反復番号 3)
8. セルにBlank(PBSのみ)を入れ、Read Blankを押す
9. →を押す
10. 試料を戻して、セルを脱イオン水で洗浄し、脱イオン水を取り除く
11. セルに試料を入れ、Read Sampleを3回押す
12. 試料を戻して、セルを脱イオン水で洗浄し、脱イオン水を取り除く
13. 10～11を繰り返す

A-6-3. SDS－PAGE による蛋白質の分離

＜使用機器・器具・試薬＞

・ゲル板(前面ガラス板、ミミ付ガラス板)（ATTO/MAB-10、MB-00）
・シリコンガスケット（ATTO/RMS-01）
・プラスチック製クリップ
・コーム（ATTO/RM10-12）
・電気泳動槽(AE-6410 型,ATTO)
・電源装置(クロスパワー500,ATTO)
・Tris(トリスヒドリキシメチルアミノメタン)（Wako/207-06275）
・SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)（Wako/199-07141）
・HCl（Wako /080-08065)
・アクリルアミド（Wako/016-00765）
・Bis (N.N'-メチレンビスアクリルアミド)（Wako/138-06032）
・APS(過硫酸アンモニウム)（ナカライテスク/02602-15）
・グリシン（Wako/077-00735）
・BPB(ブロムフェノールブルー)（Wako/021-02911）
・2－メルカプトエタノール（Wako/135-07522）
・グリセロール（Wako/079-00614）
・TEMED(N,N,N',N'－テトラメチルエチレンジアミン)（SIGMA/T9281-25ML）
・分子量マーカー（BIO-RAD/161-0318）

＜準備＞

1) 電気泳動用試薬の調製

・**1.5M Tris-HCl (pH8.8),0.4%SDS → 4℃で保存**
Tris54.5g、SDS1.2g を脱イオン水に溶かし、5N HCl(約 17ml)を加えて pH8.8 に合わせ、脱イオン水で 300ml にメスアップする。

・**0.5M Tris-HCl (pH6.8),0.4%SDS → 4℃で保存**
Tris6.0g、SDS0.4g を脱イオン水に溶かし、5N HCl(約 9ml)を加えて pH6.8 に合わせ、脱イオン水で 100ml にメスアップする。

・**0.5M Tris-HCl (pH6.8) → 4℃で保存**
Tris3.0g を脱イオン水に溶かし、5N HCl(約 5ml)を加えて pH6.8 に合わせ、脱イオン水で 50ml にメスアップする。

・**30%アクリルアミド溶液 → 4℃で保存**
アクリルアミド 58g、Bis2.0g を脱イオン水に溶かし、脱イオン水で 200ml にメスアップする。

・**0.4% SDS** → 室温で保存

SDS0.2g に脱イオン水 50ml を加えて溶解する。

・**10%APS** → 当日作製

APS 0.1g に脱イオン水 1ml を加えて溶解する。

・泳動バッファー → 室温で保存

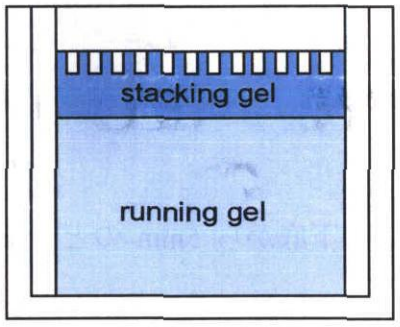
Tris3.0g、グリシン 14.4g を脱イオン水に溶かし、脱イオン水で 1000ml にメスアップする。その後、SDS1.0g を加え、溶解させる。

・サンプルバッファー → 4℃で保存

0.5M Tris-HCl (pH6.8) 2ml、0.4% SDS 4ml、2－メルカプトエタノール 1.2ml、グリセロール 2ml、脱イオン水 0.8ml、0.1%BPB 数滴を混ぜる。

・ゲル保存用バッファー(running gel を保存する際にゲル上に重層する)

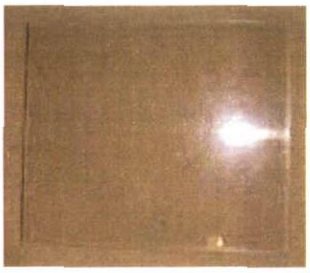
1.5M Tris-HCl(pH8.8) 0.5ml、0.4%SDS 20μl、脱イオン水 1.48ml を混ぜる。



＜操作＞

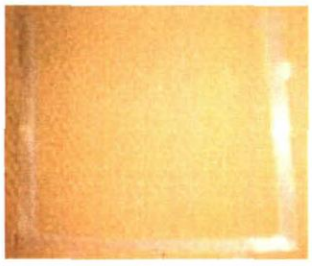
I ゲル板の組み立て

① 前面ガラス板とミミ付ガラス板、シリコンガスケットをエタノールで拭く。

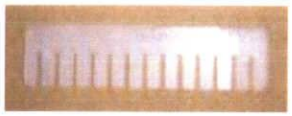


前面ガラス板

ミミ付ガラス板



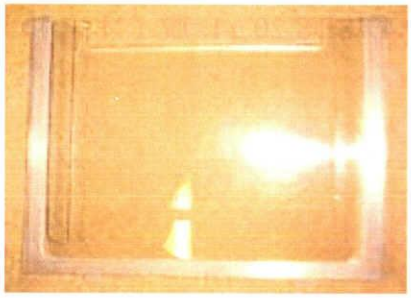
シリコンガスケット

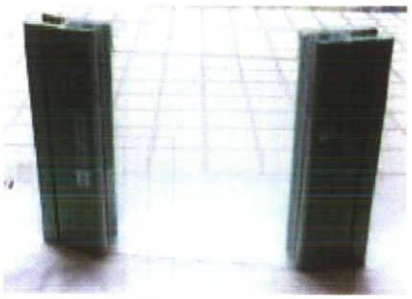


コーム

クリップ

② ミミ付ガラス板にシリコンガスケットをセットし、前面ガラス板をのせて、クリップでとめる。





③ コーム(comb)を差し込み、コームの下底から 5mm のところに目印を入れる。

II running gel、stacking gel の作製

Tabale.A-5-1 アクリルアミドゲル作成

REAGENT	アクリルアミド濃度(%)				
	Runnning gel				Stacking gel
	5%	7.5%	10%	12.5%	4.5%
分画分子量範囲	30~200kDa	40~200kDa	20~130kDa	14~80kDa	–
30% アクリルアミド溶液	2.0ml	3.0ml	4.0ml	5.0ml	0.9ml
1.5M Tris-HCl(pH8.8), 0.4%SDS	3.0ml	3.0ml	3.0ml	3.0ml	–
0.5M Tris-HCl(pH6.8), 0.4%SDS	–	–	–	–	1.5ml
APS	120μl	120μl	120μl	120μl	60μl
TEMED	12μl	12μl	12μl	12μl	6μl
脱イオン水	7.0ml	6.0ml	5.0ml	4.0ml	3.6ml
Total Volume	12.0ml	12.0ml	12.0ml	12.0ml	6.0ml

※ 目的とするタンパク質の分子量に対応して、ゲル濃度を決定する。
※ 表はゲル 1 枚分の量を示している。
※ アクリルアミドのモノマーは神経毒であるので、試薬を扱う時は手袋、マスクを着用する。

① running gel 溶液、stacking gel 溶液を上の表に従って作成する。(但し、TEMED はこの時点では加えない)
② running gel 溶液をアスピレーターで脱気する。
③ 脱気後、TEMED 12μl を加え、軽く混ぜる。
※ 微量なのでピペット操作は要注意。
④ 素早く、2)で準備したゲル板の目印のところまで running gel 溶液を入れる。
※ フラスコから直接注ぎ込む。
⑤ ピペットで脱イオン水をゲル液面上に重層する。
⑥ ゲル化するまで静置する。(5~10 分程度)
※ アクリルアミドは 20℃以下では重合しにくいため、室温に注意。(特に冬期は注意)
※ ゲルと水の界面ができていればゲル化しているので、水を捨ててキムワイプで軽く拭く。

⑦ ゲル化させている間に stacking gel 溶液をアスピレーターで脱気する。
⑧ 脱気後、TEMED 6μl を加え、軽く混ぜる。
※ 微量なのでピペット操作は要注意。
⑨ 素早く、ミミ付ガラス板の切り欠きの少し下まで stacking gel 溶液を入れる。
⑩ コームを気泡が入らないように差し込み、約 30 分間静置してゲル化させる。
※ コームを両手で持ち、水平に差し込む。

Ⅲ 各ウェルにローディングする試料溶液の調製
① 各ウェルに加えるタンパク量(100~200μg)に相当する試料の体積を BCA 法により測定した濃度から算出する。
② ①で算出してタンパク量とサンプルバッファーを 1:1 で混合する。
③ ボルテックスで攪拌する。
④ 100℃の熱湯で 3 分間ボイルする。
⑤ ボルテックスで攪拌する。

Ⅳ 電気泳動
① 電気泳動槽に底から(陽極側)泳動バッファーを入れる。
② ゲル化したらコームをそっと抜き取る。
③ クリップとシリコンガスケットを外し、ゲル板を締め付け具に固定し、電気泳動槽に入れる。
④ ゲルの上部(陰極側)が十分に浸るぐらい電解槽液を入れる。
⑤ サンプルをピペットでウェル内にゆっくり注入する。
※ ガラスにマジックでサンプル番号を書くと見やすい。
※ 分子量マーカーはサンプルバッファーを加えずに、分子量マーカー5μl のみ注入。
⑥ 電極端末を接続し電源を入れ、ゲル 1 枚のときは 15～20mA の定電流で、ゲル 2 枚のときは 30mA の定電流で泳動する。
※ BPB 線がゲル下端から 5mm の位置にくるまで泳動する。

A-6-4. ゲルの染色 (CBB 染色)

＜使用機器・器具・試薬＞
・メタノール（Wako/134-01833）
・酢酸（Wako/012-00245）
・CBB-R250(クマシーブリリアントブルー)（ナカライテスク/09408-52）

＜準備＞

・**前固定液 → 当日作製**

メタノール 20ml、酢酸 7.5ml、脱イオン水 72.5ml

・**染色液 → 室温で保存&再使用**

CBB-R250 2.5g、メタノール 500ml、酢酸 50ml、脱イオン水 450ml

・**脱色液 → 室温で保存&再使用**

メタノール 50ml、酢酸 70ml、脱イオン水 880ml

＜操作＞

① 容器にゲル全体が浸るぐらいの前固定液を入れておく。

② 電気泳動の終わったゲルを前固定液に入れる。

③ 室温で 30 分間振盪する。

④ 前固定液を捨て、染色液を入れる。

⑤ 室温で 30 分間振盪する。

⑥ 染色液をビンに戻し、脱色液を少量入れる。

⑦ 容器を軽く揺すり、染色液をすすぎ、脱色液を捨てる。

⑧ 脱色液をたっぷり入れて、キムワイプを 2,3 枚脱色液に浸けこむ。

※ 脱色の際にキムワイプを適宜交換することで、脱色を早くすることが出来る。

⑨ 室温で数時間～一晩振盪する。

A-6-5. ゲルから膜への転写(ウエスタンブロッティング)

＜使用機器・器具・試薬＞

・PVDF 膜(ポリフッ化ビニリデンメンブレン)（ATTO/2392390）

・ブロッティング濾紙（ATTO/2392393）

・ブロッティング装置

・Tris(トリスヒドリキシメチルアミノメタン)（Wako/207-06275）

・メタノール（Wako/134-01833）

・6-アミノカプロン酸（Wako/018-09642）

＜準備＞

・**A 溶液(0.3%M Tris　5%メタノール溶液) → 4℃で保存**

Tris 3.6342g を脱イオン水 50ml に溶かし、5ml のメタノールを加えて、最後に脱イオン水を加えて計 100ml とする。

・**B 溶液(25mM Tris　5%メタノール溶液) → 4℃で保存**

Tris 0.3029g を脱イオン水 50ml に溶かし、5ml のメタノールを加えて、最後に脱イオン水を加えて計 100ml とする。

・C 溶液(25mM Tris　40mM 6-アミノカプロン酸　5%メタノール溶液) → 4℃保存

Tris 0.3029g、40mM 6-アミノカプロン酸 0.5247g を脱イオン水 50ml に溶かし、5ml のメタノールを加えて、最後に脱イオン水を加えて計 100ml とする。

＜操作＞ ウエスタンブロッティング

① 電気泳動終了前に、PVDF 膜を runnin gel と同じ大きさに切り、メタノールに 20 秒ほど浸し、次に B 溶液に浸し 30 分ほど振盪させる。

② さらに、電気泳動終了前に、ブロッティング濾紙 6 枚を running gel と同じ大きさに切り、A 溶液に 2 枚、B 溶液に 1 枚、C 溶液に 3 枚浸す。

③ 電気泳動終了後、ガラス板の隙間にスパチュラを差し込み、てこの原理でガラス板をはがす

④ stacking gel を取り除き、running gel 部分のみにして、B 溶液に浸す。

⑤ 準備してあったブロッティング濾紙で、まず A 溶液に浸した濾紙 2 枚をブロッティング装置にのせる。さらに、B 溶液に浸した濾紙 1 枚、PVDF 膜、ゲル、C 溶液に浸した濾紙 3 枚の順に上へ重ねる。

⑥ グローブをはめ、手のひらで全体を押しつぶすように気泡を抜き、膜とゲルを密着させる。

⑦ 一番上の濾紙に C 溶液をかけ、陰極板をセットし、リード線をつなぐ。

⑧ ゲルの面積 $1cm^2$ あたり 2mA の定電流で約 40 分間ブロッティングする。

A-5-6. 抗体処理

＜使用機器・器具・試薬＞

・スキムミルク

・PBS（SIGMA／D8537）

・PBS 粉末（日水製薬/05913）

・TritonX-100（SIGMA/T8787-50ML）

・Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin（Dako/M0851）

・Rabbit polyclonal to beta Actin（abcam/ab 16039-500）

・HRP-Goat anti-Rabbit IgG（H+L）（Zymed/62-6120）
・HRP-Goat anti-Mouse IgG（H+L）（Zymed/62-6520）

一次抗体反応

＜準備＞

・PBS
PBS 粉末 9.6g を脱イオン水に溶解して全量を 1000ml にする。
・0.1%PBST
PBS 1ℓに Triton1.0ml を加える。
・ブロッキング液(1%スキムミルク/0.1%PBST)
PBST50ml にスキムミルク 0.5g を加える。
・一次抗体
ブロッキング液 1.0ml に一次抗体 2.0μl を加え 500 倍希釈する。

＜操作＞

① ブロッキング液に膜を浸し、over night ブロッキングする。(4℃)
② PBST で 10 分毎に 3 回洗浄。(室温)
※ ゆるやかに振盪させる。
③ ケースにパラフィルムをセットし、その上に PVDF 膜をのせ、一次抗体溶液を添加して室温下で 1 時間静置させる。
※ 抗体溶液が移動しないように水平にセットする。

二次抗体反応

＜準備＞

・二次抗体
ブロッキング液 1.0ml に HRP 標識二次抗体(HRP-Goat anti-Rabbit IgG)を 1.0μl 加え、1000 倍希釈する。

＜操作＞

① PBST で 10 分毎に 3 回洗浄。
② ケースにパラフィルムをセットし、その上に PVDF 膜をのせ、二次抗体溶液を添加して室温下で 1 時間静置させる。
※ 抗体溶液が移動しないように水平にセットする。
③ ①の操作を行う。

A-6-7. バンドの定量

＜使用機器・器具・試薬＞

・Variable Model Imager(Typhoon 8600,Amersham)

・ECL (Enhanced ChemiLuminescence)（Amersham/RPN2109）

1 液と 2 液を 500μずつとる。測定直前に混ぜる。

※アルミで遮光、氷上

※1 液と 2 液は等量混ぜ、0.125ml/cm^2 を目安に ECL の量を決める。

＜操作＞

① 洗浄した膜をラップ上にのせる。

② ECL の 1 液、2 液を混ぜ、膜上に添加する。

※ 1 分間静置させる。

③ 新しいラップ上に膜を移し、ラップで包み込む。

※ しわがつかないように包む

④ Typhoon で検出を行う。

⑤ Image Quant でタンパクの定量を行う。

※ Typhoon の操作方法

1. テーブルタップ・コンピュータ・Typhoon 本体の電源スイッチを ON にする。
2. スタートアップスクリーンが表示されたら、Ctrl,Alt,Delete キーを同時に押す。
3. Welcome ウィンドウが表示されたら、OK をクリックする。(パスワードなし)
4. サンプルをガラスプレートの上にセットする。(左下を基準にセットする)
5. デスクトップ上の「Typhoon 3.0」のアイコンをクリックして起動させる。
6. スキャンエリアを指定する。(スキャンの開始位置の座標をマウスの左ボタンでクリックしそのままスキャンするエリアをドラッグする)
7. スキャンモードを「chemiluminescence」にする。
8. set up をクリックし、sensitivity を「high」、PMT ボルテージを「950」に設定する。
9. Orientation でサンプルの表裏と方向を決定する。
10. ピクセルサイズを指定する。(50μl,100μl,200μl から選択する)
11. Image Analysis の項目を Image Quant に指定する。
12. SCAN ボタンをクリックして検出を行う。(SCAN ボタンをクリックすると

Save As ウィンドウが表示されるので、サンプルのイメージデータに名前を付けて保存する)

13. スキャン終了後、スキャンした画像が表示される。

※ Image Quant による定量方法

1. イメージの最適化
   (1) ツールバーの Grey/Color/Adjust ボタンをクリックする。
   (2) High スライダー(上側)をドラッグして、プレビューイメージ内のバンドが赤色に表示され始めたら、マウスボタンを放します。
   (3) Low スライダー(下側)を打ラッグして、プレビューイメージ内のバックグラウンドが紫色に表示され始めたら、マウスボタンを放します。

(4) OK をクリックする。(イメージウィンドウの表示イメージに変更内容が適用され、Grey/Color/Adjust ウィンドウが閉じる)

2. レクタングルの作成
   (1) ツールバーの Rectangle ボタンをクリックする。
   (2) 目的のバンドにポインターを当て、バンドがレクタングルで完全に囲まれるまで、ポインターをドラッグします。
   (3) Select ボタンをクリックする。
   (4) 作成したレクタングルの内部中央にポインターを合わせ、マウスボタンを押したまま、キーボードの v キーを押す。
   (5) マウスボタンを押したまま、次のレーンのバンドがレクタングルで囲まれるように移動させる。
   (6) この操作を繰り返し、各レーンのバンドにレクタングルを作成する。
3. ボリューム解析の評価
   (1) Select ボタンが選択されていることを確認する。
   (2) レクタングルの 1 つをクリックする。
   (3) ツールバー(下)の Volume Review ボタンをクリックすると解析評価が表示される。

A-7. 三次元遊走モデルの作成

A-7-1. Type Ⅰ collagen gel 溶液の作成

＜使用機器・器具・試薬＞

- Millex-GV（MILLIPORE/Cat.No.SLGV025LS/孔径 0.22 μm）
- Strivex GS（MILLIPORE/Cat. No.SVGSB1010/孔径 0.22 μm）
- 15ml 遠心管（住友ベークライト/MS-56150）
- 50ml 遠心管（住友ベークライト/MS-56500）
- Cellmatrix Type Ⅰ－A（新田ゼラチン/637-00653）
- HEPES 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid（Wako/340-01371）
- $NaHCO_3$（Wako/038-10531）
- 1NNaOH(196-05635/Wako)
- 1NHC l (080-08065/Wako)
- 10 倍濃縮培地(M199 倍地)（新田ゼラチン/02-069-010）

＜準備＞

試薬 A.3.0mg/ml pH3.0 Cellmatrix Type Ⅰ-A

試薬 B.10 倍濃縮培地

試薬 C.再構成用緩衝溶液

0.05N NaOH 溶液 100ml に対して $NaHCO_3$ 2.2g、HEPES4.77g を溶解させ、0.22μm フィルターで濾過滅菌を行った。

※大量に貯蔵しておくと、$NaHCO_3$ から CO_2 が抜けていくため、5ml ずつ分注して密封保存しておく。

＜操作＞

しっかりと低温状態を保つため、全て氷上操作で行う。またゲル濃度によって各よう液の混合量が異なるため Table.A-6-1 に従うこと。

① A、B、C 液を 8:1:1 となるように 50ml 遠心管内で混合する。この際 A 液と B 液を混合した後にあわ立てないようによく撹拌し、さらに C 液を加えよく混ぜる。

※色を見ながら pH7.4 になるように、緩衝溶液の量で調節する。あるいは 1N HCl や NaOH で調節を行う。5μl 前後を加えながら微調

整するとよい。

※あらかじめ pH7.3、7.4、7.5 の標識標本を水:10 倍濃縮培地:緩衝溶液が 8:1:1 となるようにして作っておくこと。

② M199 培地を加え、ゆっくりと振り混ぜる。

それぞれのゲル濃度の溶液を 1.8ml 作るとすると、それぞれの溶液の割合は以下の表のようになる。

Table.A-6-1 Type Ⅰ collagen gel 作成

(ml) \ ゲル濃度（mg/ml）	2.0	1.5	1.0	0.5
Cellmatrix Ⅰ-A(μl)	1200	900	600	300
濃縮培地 199(μl)	150	112.5	75	37.5
緩衝溶液(μl)	150	112.5	75	37.5
M199 培地(μl)	300	675	1050	1425

A-7-2. Fibronectin in Type Ⅰ collagen gel または BSA in type Ⅰ collagen gel 溶液の作成

＜使用機器・器具・試薬＞

- Millex-GV（MILLIPORE/Cat.No.SLGV025LS/孔径 0.22 μm）
- Strivex GS（MILLIPORE/Cat. No.SVGSB1010/孔径 0.22 μm）
- 15ml 遠心管（住友ベークライト株式会社／Cat.No.MS-56150）
- 50ml 遠心管（住友ベークライト株式会社／Cat.No.MS-56500）
- Cellmatrix Type Ⅰ－A（新田ゼラチン/637-00653）
- HEPES 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid（Wako/340-01371）
- $NaHCO_3$（Wako/191-01305）
- 1NNaOH(196-05635/Wako)
- 1NHC l (080-08065/Wako)
- 10 倍濃縮培地(M199 倍地)（新田ゼラチン/02-069-010）
- BSA（Wako/019-07494）
- Fibronectin（三光純薬/341635）

※原液濃度 1g/ml ⇒ M199 培地で 50μg/ml に希釈して分注後、冷凍庫にて－20℃で保存。解凍する際にはゲル化してしまうため振り混ぜないこと。

＜準備＞

試薬 A.3.0mg/ml pH3.0 Cellmatrix Type Ⅰ-A

試薬 B.10 倍濃縮培地

試薬 C.再構成用緩衝溶液

0.05N NaOH 溶液 100ml に対して $NaHCO_3$ 2.2g、HEPES4.77g を溶解させ、0.22μm フィルターで濾過滅菌を行った。

※大量に貯蔵しておくと、$NaHCO_3$ から CO_2 が抜けていくため、5ml ずつ分注して密封保存しておく。

＜操作＞

しっかりと低温状態を保つため、全て氷上操作で行う。またゲル濃度によって各よう液の混合量が異なるため Table.A-6-2 に従うこと。

① A、B、C 液を 8:1:1 となるように遠心管内で混合する。この際 A 液と B 液を混合した後にあわ立てないようによく撹拌し、さらに C 液を加えよく混ぜる。

※色を見ながら pH7.4 になるように、緩衝溶液の量で調節する。あるいは 1N HCl や NaOH で調節を行う。5μl 前後を加えながら微調整するとよい。

※あらかじめ pH7.3、7.4、7.5 の標識標本を水:10 倍濃縮培地:緩衝溶液が 8:1:1 となるようにして作っておくこと。

② FN または BSA 及び M199 培地を加え、撹拌する。

それぞれのゲル濃度の溶液を 1.8ml 作るとすると、それぞれの溶液の割合は以下の表のようになる。

TableA-6-2 FN 及び BSA in Type Ⅰ collagen gel 作成

(μl) ＼ ゲル濃度（mg/ml）	2.0	1.5	1.0	0.5
Cellmatrix Ⅰ-A	1200	900	600	300
濃縮培地 M199	150	112.5	75	37.5
緩衝溶液	150	112.5	75	37.5
M199 培地	300	315	690	1065
FN または BSA (μl)		360	360	360

※FN または BSA 有りの場合（ゲル作成時は FN 濃度 10μg/ml ⇒ 拡散後は 5μg/ml、BSA 濃度 7.5μg/ml ⇒ 1.5μg/ml）

A-7-3. HPMC への TGF－β1 誘導による EMT の誘導

＜使用機器・器具・試薬＞

- 6 穴プレート（住友ベークライト/NS80060）
- TGF-β1（SIGMA/T7039-2-UG）
- M199（SIGMA / F9423）
- FBS（SIGMA /F9423）

＜操作＞

① 6 穴プレートに HPMC を播種し、subconfluent になるまで培養する。,

② 0.1%FBS/M199 で 24 時間 growth arrest する。

③ 6 穴プレートの培地を吸引し、3 穴分に 10ng/ml TGF-β1/0.1%FBS/M199 を 2ml/well ずつ加え、48h 培養する。

A-7-4. トランスウェルを用いた HPMC の間質への遊走モデルの作成

＜使用機器・器具＞

- ミリセル PCF（膜孔 12μm）（MILLIPORE/PIXP 012 50）
- 24 穴プレート（住友ベークライト/MS-80240）
- APPENDIXA-5-1 で作成した混合用液
- APPENDIXA-5-2 で作成した混合用液
- M199（SIGMA/M2154）
- FBS（SIGMA /F9423）
- PBS（SIGMA/D8537）
- TRYPSIN-EDTA SOLUTION（10x）（SIGMA/T4174）
- 血球計算盤

＜操作＞

① あらかじめ膜を 300μl の M199 で浸しておく。

② APPENDIXA-5-1 または APPENDIXA-5-2 で作成した 1.5mg/ml コラーゲンゲル 200μl を 24 穴プレート lower に加え、均一になるように整える。

※ピペットを押し切ると空気が入るため、ゲルに空気が入らないように注意する事。

③ 37℃で 30 分間インキュベートする。

④ ②で作成したゲル上にAPPENDIXA-5-1で作成した0.5mg/mlコラーゲンゲル200μlを積層し、均一になるように整える。
⑤ ①の膜から培地を抜き取り、コラーゲンゲル上へ乗せる。
※膜とゲルの間に空気が入らないように、ゆっくりと乗せる。
⑥ 0.1%FBS/M199 300μlを膜に加え、37℃でFNの拡散の場合は48hまたは72h、BSAの拡散の場合は16hまたは24hインキュベートする。
⑦ 膜から0.1%FBS/M199を抜き取り、10ng/ml TGF-β1/0.1%FBS/M199を300μl加え、プレインキュベートする。またupperとlower液面が同一になるように、lowerのゲル上部にM199を100μlほど加えて調節する。
⑧ APPENDIXA-5-3で培養した6穴プレートから培地を吸引し、PBSを加え洗浄する。
⑨ 10%trypsin/PBSを1ml加え、細胞がはがれているか顕微鏡で確認する。
⑩ セルスクレイパーで細胞をはがし、3穴分をまとめて15ml遠心管に移す。
⑪ 750rpm/5分遠心分離を行う。
⑫ 上澄み液を吸い取り、1mlの0.1%FBS/M199を加え、細胞懸濁液を作成する。
⑬ 血球計算盤で細胞数をカウントし、1穴当り細胞数が5万個となるようにupperに播種後、軽くピペッティングを行う。
⑭ 72h培養する。

A-7-5. 遊走細胞数の計測

＜使用機器・器具＞

- 撹拌遠心機（LABINCO/2790001）
- 血球計算盤
- オリンパス倒立型顕微鏡（OLYMPUS/CK2）
- Collagenase S-1（Wako/038-10531）
- M199（SIGMA/M2154）
- PBS（SIGMA/D8537）
- TRYPSIN-EDTA SOLUTION（10x）（SIGMA/T4174）
- ディフ・クイック（シスメックス/16920）

＜操作＞

I upper 側

① APPENDIXA-5-4 で培養したトランスウェルの upper から培地を吸い取り、15ml 遠心管に移す。

② 750rpm/5 分遠心分離を行う。

③ 上澄み液を吸い取り、70μl 程度の M199 を加え、細胞懸濁液を作成する。

※上澄み液の吸い取ったあとに残った液量によって、細胞懸濁液量が多少異なってしまうため、この際にピペットなどで全容液量を確認しておくこと。

④ 血球計算盤にて細胞数を計測する。

II 膜上、膜下

① 膜上、膜下に 10%trypsin/PBS 溶液に浸し、10 分間インキュベートをする。

② プレートを軽くゆすり、数回膜へピペッティングを行い、膜上、膜下の液をそれぞれ 15ml 遠心管に移す。

③ 750rpm/5 分遠心分離を行う。

④ 上澄み液を吸い取り、70μl 程度の M199 を加え、細胞懸濁液を作成する。

※上澄み液の吸い取ったあとに残った液量によって、細胞懸濁液量が多少異なってしまうため、この際にピペットなどで全容液量を確認しておくこと。

⑤ 血球計算盤にて細胞数を測定する。

III 膜内

① ディフクイック固定液に 5 回/秒浸す。

② ディフクイック染色液 I に 5 回/秒浸す。

③ ディフクイック染色液 II に 5 回/秒浸す。

④ CAMEDIA（200 倍）で染色された細胞数を数える（10 視野）

※染色液に浸す時間及び回数は染色の度合いを見て、調節すること。

IV gel

① lower 内 collagen gel をピペットチップでゆっくりとかき回し、細かい断片にわける。

② Collagenase S-1 を 40μl（最終濃度が 0.02%となるように、すなわち

ゲル 1ml に対して 100μl）を加え、溶液が全体に浸透するように再びピペットチップでかき混ぜる。

③ 37℃で 30 分インキュベートする。

④ lower からピペットを用いて液を吸い、15ml 遠心管に移す。

⑤ 750rpm/5 分遠心分離を行う。

⑥ 上澄みを吸い取り、M199 1ml を加えて、軽く vortex をかける。

⑦ 750rpm/5 分遠心分離を行う。

※⑥、⑦の操作を 2、3 回繰り返し、細胞を洗浄する。

⑧ 上澄み液を吸い取り、M199　70μl 程度加え、細胞懸濁液を作成する。

※上澄み液の吸い取ったあとに残った液量によって、細胞懸濁液量が多少異なってしまうため、この際にピペットなどで全容液量を確認しておくこと。

⑨ 血球計算盤にて細胞数を測定する。

A-8. 細胞増殖試験

＜使用機器・器具・試薬＞

- 6穴プレート（住友ベークライト/NS80060）
- M199培地（SIGMA/M2154）
- FBS（SIGMA / F9423）
- TGF-β1（SIGMA/T7039-2-UG）
- FN（三光純薬/341635）
- デジタルカメラ CAMEDIA C-3040 ZOOM
- 位相差顕微鏡 CK2（OLYMPUS/CK2）

＜操作＞

① 6穴プレートに10%FBS/M199を2mlずつ加え、プレインキュベートする。

② $75cm^2$ に confluent に培養した HPMC を継代作業し、細胞懸濁液を作成する。

③ 血球計算盤にて細胞数をカウントし、5×10^4 個/1穴となるように6穴プレートに播種する。

④ 播種後24h培養し、細胞を接着させる。

⑤ 培地を吸引後、0.1%FBS/M199を2ml加え24h培養し、Growth arrestを行う。

⑥ 培地を吸引し、以下の4種類の条件の培地をそれぞれ2ml加える。

- 10%FBS/M199
- 0.1%FBS/M199
- 0.1%FBS/M199 + 10ng/ml TGF-β1
- 0.1%FBS/M199 + 10ng/ml TGF-β1 + 10μg/ml FN

⑦ 位相差顕微鏡で確認しながら注射針を用いて、それぞれの条件のプレート底面に3箇所ずつ印（傷）をつける。

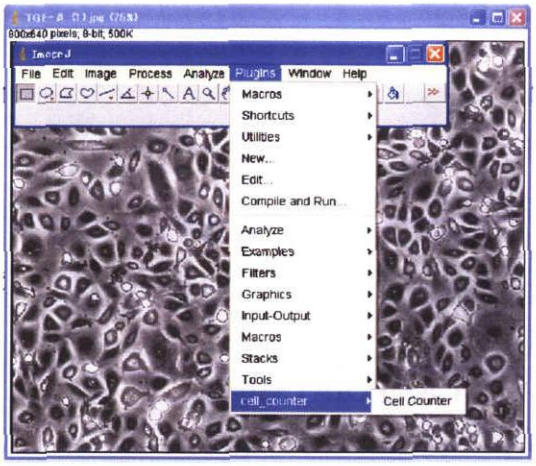
⑧ 培養 0、24、48、72、96h ごとに印を付けた同一部位を、デジタルカメラにて撮影を行う。

⑨ 撮影した画像データから細胞数をカウントする。

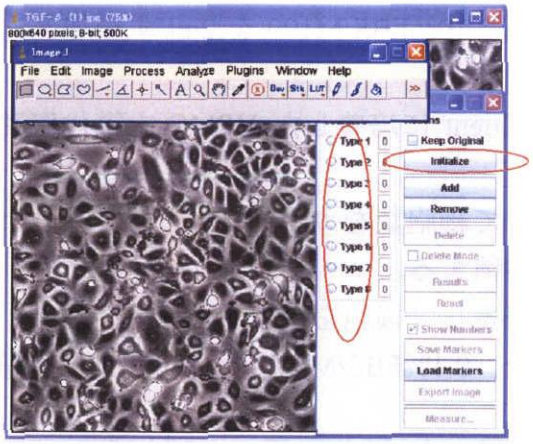
A-8-1. 細胞数のカウント(Image J)

① 動画解析同様に、①を行なう

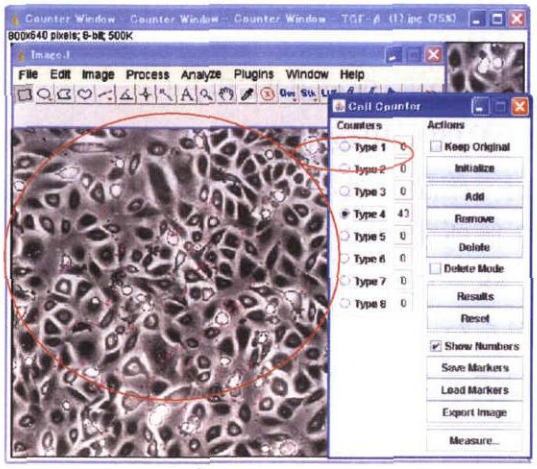
② 「Plugins」を選択し、「cell_counter」→「cell counter」を選択する



③ cell counter のツールバーから、「Initialize」→「Type１～８」を選択し、細胞をクリックする。



④ クリックしていくと、「Type1~8」の横に細胞数が表示される。



＊細胞がはっきりして見やすいようなら、動画解析と同様に処理を行なうことですばやく細胞数を測定することができる。(cell counter を使う必要がない)

B-1. 滅菌について

＜高圧蒸気滅菌＞

高圧蒸気滅菌（オートクレーブ）は、滅菌したい器具を専用の滅菌缶や金属缶、ケースなどに入れ、滅菌テープで封印し 121℃/20 分にて行う。滅菌後は 50℃のオーブンに入れ、乾燥・保管する。

液体の高圧蒸気滅菌は専用の耐圧ビンに入れて行う。但し、液体は全体が均一な温度（121℃）になるまで時間が掛かるため、通常の器具滅菌の場合よりも 1L あたり 20 分程度余分に行う。

＜乾熱滅菌＞

乾熱滅菌も滅菌したい器具を専用の滅菌缶や金属缶に入れて行う。ピペットの場合は吸入口に専用の綿を詰め、滅菌缶に入れて滅菌する。その他のガラス器具などは口にアルミホイルで蓋をし、そのまま滅菌する。乾熱滅菌の温度と時間は以下の通り（Table.B-1-1）。

Table.B-1-1 乾熱滅菌

一般的な滅菌	RNase free にするための滅菌
160～170℃/2～4h もしくは 180～200℃/0.5～1 時間	180℃/8 時間以上（Over Night） もしくは 250℃/0.5 時間以上

※ 乾熱滅菌は冷めるまでが滅菌である。必ず冷めるまで待つこと。

※ 高圧蒸気滅菌と乾熱滅菌のいずれの場合も、必ず滅菌対象の材質・耐熱温度を確認すること。機器の損傷の恐れもある。

＜ガス滅菌＞

高温耐性のない器具を滅菌する際に使用する。滅菌対象物とガスのバイアル瓶を専用の袋に入れ、密封後にガスのバイアル瓶を折り、ガスを充満させる。このガスは人体にも有害であるため、作業は必ずドラフト内で行い、開始後 2 週間程度ドラフト内に放置する。

＜UV 殺菌＞

クリーンベンチは使用後に必ず UV 殺菌灯を点灯し、ベンチ内を殺菌する。その際、ベンチ内のプラスチック製品はアルミホイルで巻くこと。

＜主要器具の滅菌方法＞

○ クリーンベンチ内器具一式

・ ピンセット ×1
・ 50 ml、100 ml ビーカー ×各 1
・ シャーレ ×2

① ブラッシングにより洗浄後、水洗いし、蒸留水で軽くリンスする。
② 滅菌缶に器具を詰め、滅菌テープで封印し 121℃/20 分にて高圧蒸気滅菌を行う。

○ 手術器具一式

・ ピンセット（拘つき）×1、（拘無し）×3～4
・ ハサミ（直、先丸）×各 1
・ 鉗子 ×1
・ 滅菌糸（20cm 程度のもの）×20

専用の金属トレイに器具を詰め、滅菌テープで封印し 121℃/20 分にて高圧蒸気滅菌を行う。

○ チップ、Reaction Tube with Cap（PCR 専用チューブ）

専用のケース、金属缶に詰め、滅菌テープで封印し 121℃/20 分にて高圧蒸気滅菌を行う。詰める作業は必ず手袋を着用して行うこと。

○ 10 ml ピペット、パスツールピペット

① 20 倍希釈の無りん洗剤に約 24 時間浸漬後、約 24 時間水洗いする（浸漬液は 2 ヶ月毎に交換する）。
② 水気を切り、10ml ピペットは吸入口に綿栓を、パスツールピペットは綿栓をせず、3 本毎にアルミホイルで巻く。
③ 滅菌缶にピペットの種類毎に 6 割程度詰め、180℃で 4 時間乾熱滅菌する。

○ ゲル作成用三角フラスコ、メスシリンダー

① ブラッシングにより洗浄後、水洗いし、蒸留水で軽くリンスする。
② 乾燥後、口に 7cm 四方程度のアルミホイルで蓋をする。
③ そのまま 180℃/Over Night にて乾熱滅菌を行う。

B-2. Primer List

本研究にて使用した Primer の詳細を以下に示す。

TableB-2-1 Primer List

Primer	Sequence		Cycle	Size (bp)
GAPDH[49]	sense	5'-GAT GTC ATC ATA TTT GGC AGG TT-3'	29	322
	antisense	5'-CCT GCA CCA CCA ACT GCT TAG CCC-3'		
Snail[50]	sense	5'-TCA GAC GAG GAC AGT GGG AAA G-3'	38	487
	antisense	5'-GCT TGT GGA GCA GGG ACA TTC-3'		
E-cadherin[50]	sense	5'-TCC CAT CAG CTG CCC AGA AA-3'	36	500
	antisense	5'-TGA CTC CTG TGT TCC TGT TA-3'		
α 5-integrin[51]	sense	5'-GGC ATC AGA GGT GGC TGG AGG CTT-3'	39	453
	antisense	5'-GGC AGC TAT GGC GTC CCA CTG TGG-3'		
MMP-2 [57]	sense	5'-ACA GCC TGG CAT GGG GCA AGT -3'	29	292
	antisense	5'-TTC TCC TCC ATC CAG TGG AG-3'		

※ Primer の作成は Invitrogen 株式会社に外注した。

B-3. RT / PCR program

本研究にて使用したRT及びPCR programの詳細を以下に示す。

＜RT program＞

Table.B-2-3 RTprogram

Program	Step	Temp／Time
RT program 01	1	95.0℃／5 min
	Hold	4.0℃／∞
RT program 02	1	20.0℃／20 min
	2	42.0℃／40 min
	3	95.0℃／5 min
	Hold	4.0℃／∞

＜PCR program＞

Table.B-2-4 PCRprogram

Primer	Cycles	Step	Pre-PCR	PCR-cycles	Post-PCR
GAPDH	29	denature	94.0℃／3 min	94.0℃／30 sec	94.0℃／40 sec
		annealing	60.0℃／1 min	60.0℃／1 min	60.0℃／10 min
		extension	72.0℃／1 min	72.0℃／1.5 min	—
		Hold	—	—	4.0℃／∞
Snail	38	denature	95.0℃／3 min	94.0℃／1 min	—
		annealing	—	58.0℃／1 min	—
		extension	—	72.0℃／1 min	72.0℃／10 min
		Hold	—	—	4.0℃／∞
E-cadherin	36	denature	95.0℃／3 min	94.0℃／1 min	—
		annealing	—	58.0℃／1 min	—
		extension		72.0℃／1 min	72.0℃／10

					min
		Hold	—	—	4.0℃／∞
⟨5-integrin	36	denature	95.0℃／30 s	95.0℃／30 s	—
		annealing	—	58.0℃／30 s	—
		extension	—	72.0℃／30 s	72.0℃／7 min
		Hold	—	—	4.0℃／∞
MMP-2	29	denature	94.0℃／5 min	—	—
		annealing	—	94.0℃／1 min	—
		extension	—	60.0℃／1 min	72.0℃／1 min
		hold	—	—	4.0℃／∞

※ 出展は Primer と同様

DEPC 処理水の作成

① Milli-Q 水を密閉できるガラスビン（青蓋の 500ml メディウムビン）に入れる。

② 500ml の Milli-Q 水に対し DEPC を 500μl （0.1%）加え、蓋をきっちり締めてよく振り混ぜる。

※ DEPC は発癌性があるため、この作業は全てドラフト内で行うこと。

③ そのまま 37℃のオーブン内に入れ、2 時間加温する。加温の途中に何回か振り混ぜること。

※ 振り混ぜることでビンの蓋や首の部分、液体内に DEPC が均一に広がり、全体の RNase を失活させる。

④ ビンの蓋を十分緩めて、121℃/40 分（1 本あたり 500ml の場合）高圧蒸気滅菌にかける。

※ 高圧蒸気滅菌をすることにより DEPC を除去する。滅菌後にも DEPC の臭いが残っている場合は、もう一度高圧蒸気滅菌を行う。

※ DEPC は発癌性であるため、むやみに蒸気を吸わないよう気を付けること。また、滅菌装置内に溜まった水は、気化して抜けた DEPC が溶け込んでいるので、その排水は責任を持って処理すること（大量の水と共に排水口へ）。

滅菌水の作成

① 脱イオン水を密閉できるガラスビン（赤蓋の 1L メディウムビン）

に入れる。

② 蓋をきっちり締めた後、滅菌テープで封印し 121℃/40 分にて高圧蒸気滅菌を行う。

B-4. 統計処理

＜使用機器・器具・試薬＞

・ Stat View for Windows(ver.5.0/SAS Institute Inc.)

＜操作＞

① Stat View を起動した。

②「ファイル」の「新規」を選択し、以下のように入力した。

	列 1	列 2	
タイプ：	文字列	実数	実数
ソース：	ユーザー入力	ユーザー入力	ユー
クラス：	名義変数 N	連続変数 C	連続
表示形式：	・	固定小数点自由形式	固定
小数点位置：	・	3	3
1	control	1.000	
2	control	1.000	
3	100mM glucose	.989	
4	100mM glucose	1.021	

サンプル名を入力　測定値を入力

Fig.B-1 Stat View 記入例

③「解析」の「新規ビューシート」を選択し、変数一覧の列 1、列 2 をダブルクリックした。

④ 2 群の比較(対応なし)を選択し解析実行した。

⑤ OK.をクリックし、P 値を求めた。